

ENDOTOXINEN EN DE LEVER

**Een onderzoek naar het voorkomen en de betekenis
van endotoxinemie bij leverziekten**

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE
AAN DE ERASMUS UNIVERSITEIT ROTTERDAM
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
PROF. DR. J. SPERNA WEILAND
EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.
DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATSVINDEN OP
WOENSDAG 10 DECEMBER 1980 DES NAMIDDAGS
TE 3.45 UUR

DOOR

ADRIANUS CORNELIS MARIA VAN VLIET

geboren te Vlaardingen

1980

grafische verzorging:
davids decor alblaserdam

PROMOTOREN: PROF. J.H.P. WILSON

PROF. DR. M.F. MICHEL

CO-REFERENT: PROF. DR. D.L. WESTBROEK

Aan mijn ouders
Nanny en Martin

INHOUD

LIJST VAN GEBRUIKTE AFKORTINGEN	12
---------------------------------------	----

HOOFDSTUK 1

INLEIDING EN DOELSTELLINGEN	13
-----------------------------------	----

HOOFDSTUK 2

ENDOTOXINEN EN HUN EFFECTEN	15
-----------------------------------	----

Inleiding	15
Chemische samenstelling van endotoxinen	16
<i>Het lipide-gedeelte</i>	16
<i>De R-kern</i>	16
<i>Het O-polysaccharide</i>	16
Enkele chemische kenmerken van een lipopolysaccharide	17
Effecten van endotoxinen	19
<i>Koorts</i>	20
<i>Effecten op bloedcellen</i>	20
<i>Effecten op de bloedstolling</i>	21
<i>Effecten op de hemodynamiek</i>	21
<i>Effecten op de nieren</i>	21
<i>Antigene eigenschappen</i>	22
<i>Complement</i>	22
<i>Metabole effecten</i>	22
<i>Het Schwartzman-fenomeen</i>	23
<i>Tolerantie</i>	23
Bescherming tegen endotoxinen-effecten	24
De darm als bron van endotoxinen	25
Effecten van endotoxinen op de lever	25
<i>De acute effecten en het belang van een goed functionerend RES</i>	25
<i>Effecten op langere termijn</i>	26

<i>Enkele andere effecten van endotoxinen op de lever</i>	26
<i>Effecten op de histologie van de lever</i>	27
Endotoxinen en leverziekten bij de mens	27

HOOFDSTUK 3

ENDOTOXINENBEPALING	29
In vivo methoden	29
<i>De konijnenpyrogeentest</i>	29
Andere in vivo methoden	30
<i>a. De letaliteitsbepalingen</i>	30
<i>b. De serumijzerbepaling</i>	31
<i>c. De huidtest</i>	31
In vitro methode: de limulustest	32
<i>Naamgeving</i>	33
<i>Het ontstaan van de limulustest</i>	33
<i>De limulustest</i>	33
<i>Biochemische basis voor de limulustest</i>	34
Correlatie limulustest met konijntest	35
Gevoeligheid en specificiteit van de limulustest	35
Toepassing van de limulustest	36
Recente en mogelijk toekomstige ontwikkelingen van de limulustest	37

HOOFDSTUK 4

METHODEN VAN ONDERZOEK	39
De limulustest	39
<i>Inleiding</i>	39
<i>Uitvoering van de limulustest</i>	41
De bepaling van de werking van het reticulo-endotheliale systeem	42
<i>Inleiding</i>	42
<i>Uitvoering</i>	43
<i>Bespreking</i>	45
De lysozymbepaling	45
<i>Inleiding</i>	45
<i>Uitvoering</i>	45
De bereiding van chroom-51 gemerkt endotoxine	46
<i>Inleiding</i>	46
<i>Uitvoering van de merking</i>	46

De prekallikreïne-bepaling	47
<i>Inleiding</i>	47
<i>Uitvoering</i>	48
De gebruikte statistische methoden	49

HOOFDSTUK 5

RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK BIJ PATIENTEN MET ACUTE HEPATITIS	51
---	----

Inleiding	51
Opzet en uitvoering van het onderzoek	51
Resultaten	52
<i>Endotoxinemie en acute hepatitis</i>	52
<i>RES-functie en acute hepatitis</i>	54
Discussie	55
Conclusie	58

HOOFDSTUK 6

RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK BIJ PATIENTEN MET LEVER-CIRROSE EN EEN MESOCAVALE SHUNT	59
---	----

Inleiding	59
Patiënten en methoden	60
Resultaten	61
<i>Het na-onderzoek</i>	61
<i>Endotoxinen-bepaling en meting van RES-functie</i>	61
<i>Het onderzoek naar het bestaan van varices</i>	61
<i>Het gehalte aan totaal eiwit, albumine en gammaglobuline in serum</i>	64
<i>Enkele andere gegevens verkregen bij het na-onderzoek</i> ...	69
<i>Het overlijden na een mesocavale shuntoperatie</i>	69
Discussie	70
Conclusie	74

HOOFDSTUK 7

RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK BIJ KLINISCHE PATIENTEN MET LEVERCIRROSE	75
--	----

Inleiding	75
Patiënten en methoden	76
<i>Levercirrose</i>	76
<i>Ascites</i>	76
<i>Bepalingen</i>	76
Resultaten	77
<i>Endotoxinemie bij levercirrose</i>	77
<i>De prognose bij patiënten met endotoxinemie</i>	78
<i>Plasma-prekallikreïnespiegel en endotoxinemie bij levercirrose</i>	81
<i>RES-functie en endotoxinemie bij levercirrose</i>	83
<i>Resultaten van de endotoxinenbepaling in ascites</i>	84
Discussie	87
Conclusie	91

HOOFDSTUK 8

RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK NAAR ABSORPTIE UIT DE DARM VAN ENDOTOXINEN	93
--	----

Inleiding	93
Opzet en uitvoering van het onderzoek	94
<i>Endotoxinen-absorptie bij de mens</i>	94
<i>Endotoxine-absorptie bij de rat in vivo</i>	94
<i>Endotoxine-absorptie bij dunne darmlussen van de rat in vitro</i>	96
<i>Berekening van endotoxine-absorptie in vivo en in vitro</i> ...	97
Resultaten	97
<i>Patiënten</i>	97
<i>Dierproeven</i>	98
Discussie	101
Conclusie	105

HOOFDSTUK 9

BESPREKING	107
------------------	-----

SAMENVATTING	113
--------------------	-----

SUMMARY	117
---------------	-----

LITERATUURLIJST	121
VERANTWOORDING	139
CURRICULUM VITAE	141

LIJST VAN GEBRUIKTE AFKORTINGEN

Ci	Curie
⁵¹ Cr	radio-actieve isotoop van chroom
E	eenheden
EDTA	ethyleendiaminetetra-acetaat
ET	endotoxinen
g	gram of relatieve centrifugale kracht
γ GT	gamma-glutamyl transpeptidase
GOT	glutamaat oxaalazijnzuur transaminase
GPT	glutamaat pyruvaat transaminase
Gy	Gray (1 Gy = 100 rad)
HMK	hoog molecuair kininogeen
HBsAg	hepatitis B virus oppervlakte-antigeen
iv	intraveneus
M	mega (10 ⁻⁶) of molair
μ	micro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³)
MBq	mega-Becquerel (1 mCi = 37 MBq)
MeV	mega-elektronVolt
min	minuten
n	aantal patiënten (of aantal experimenten)
ng	nanogram (10 ⁻⁹ gram)
nm	nanometer
NS	niet significant
p	waarschijnlijkheid
r	correlatie coëfficiënt
RES	reticulo-endotheliale systeem
S	zwavel
SD	standaard deviatie
SEM	standard error of the mean
T/2	halfwaarde-tijd
^{99m} Tc	radio-actieve metastabiele isotoop van technetium
\bar{x}	gemiddelde

1 INLEIDING EN DOELSTELLINGEN

Endotoxinen zijn celwandbestanddelen van gramnegatieve bacteriën en kunnen bij toediening aan proefdieren een groot aantal effecten veroorzaken, die schadelijke gevolgen kunnen hebben. Daartoe behoren o.a. het activeren van de bloedstolling, het doen ontstaan van trombopenie, gestoorde nierfunctie, hypotensie en toxische invloeden op de lever. Ook kunnen zij aanleiding geven tot productie van antilichamen.

Het reticulo-endotheliale systeem vooral van lever en milt, zorgt voor de verwijdering van endotoxinen uit de circulatie. Hierbij spelen de Kupffercellen als fagocyterende cellen van de lever een zeer belangrijke rol. Bij levercirrose is de fagocytosecapaciteit van de lever verminderd. Dit uit zich o.a. in een verminderde opname in de lever van intraveneus toegediend radio-actief gemerkt colloïd en in een toegenomen opname van deze stof in de milt en het beenmerg. De verminderde opname door de cirrotische lever geldt niet alleen voor colloïd, maar ook voor antigenen (Thomas e.a. 1973, Triger en Wright 1973).

Vanuit de darmen kunnen antigenen, waaronder endotoxinen, worden geabsorbeerd (Thomas en Jewell 1979a). Bij verminderde klaring van deze antigenen uit het portale bloed door de lever zal er meer in aanraking komen met andere organen zoals b.v. de milt. In tegenstelling tot de lever bezit de milt het vermogen tot antilichaamproductie en het gevolg is dan ook een toename in aanmaak van antilichamen (Thomas e.a. 1973, Triger en Wright 1973). Bij chronisch leverlijden is het gehalte aan gammaglobuline in het serum vaak verhoogd en kunnen verhoogde titers aan antilichamen tegen darmbacteriën worden aangetoond (Björneboe e.a. 1972, Triger e.a. 1972). Hoe meer de architectuur van de lever is verstoord, hoe hoger het gehalte aan antilichamen in serum (Prytz e.a. 1977).

In de vena portae zijn bij de mens geen bacteriën maar wel endotoxinen aanwezig (Dencker e.a. 1974, Jacob e.a. 1977). Bij gestoorde fagocytose door de lever kan dus een endotoxinemie ontstaan met als gevolg, behalve een toename in antilichaamproductie, ook het ontstaan van toxische verschijnselen.

Leverziekten gaan gepaard met verschijnselen die gelijken op effecten van endotoxinen. Bij acute leverinsufficiëntie kan het optreden van stollingsstoornissen en hypotensie een groot probleem zijn (Trewby en Williams 1977, Van Vliet e.a. 1977). Bij deze ernstige leveraandoening zijn behalve hersenoedeem de belangrijkste doodsoorzaken: hypotensie, stollingsstoornissen met bloedingen en nierfunctiestoornissen (Sherlock 1975a, Berk en Popper 1978). Ook bij levercirrose gaan deze complicaties gepaard met een hoge mortaliteit (Galambos 1979c). De genoemde problemen leiden

niet altijd tot de dood. Ze kunnen zowel bij levercirrose als bij acute hepatitis in minder uitgesproken vorm optreden.

De oorzaak van deze problemen is niet goed duidelijk. Eén van de mogelijkheden is dat endotoxinen aanleiding geven tot de stollingsstoornissen, de nierfunctiestoornissen en de hypotensie (Nolan 1975, Trewby en Williams 1977, Berk en Popper 1978). Uit recente publicaties blijkt dat endotoxinen inderdaad in bloed van patiënten met leverziekten, zoals acute leverinsufficiëntie en levercirrose, kunnen voorkomen (Wilkinson e.a. 1974, Clemente e.a. 1977, Liehr en Grün 1977). Het onderzoek naar het voorkomen van endotoxinemie bij levercirrose werd in belangrijke mate gestimuleerd door het recent beschikbaar komen van een gevoelige en specifieke in vitro test voor het aantonen van endotoxinen (Levin e.a. 1972, Cooperstock e.a. 1975).

De doelstellingen van het onderzoek, waarvan de resultaten in dit proefschrift worden beschreven, zijn:

1. Inzicht te verkrijgen in de frequentie van het optreden van endotoxinemie bij leverziekten, zoals acute hepatitis en cirrose.
2. Vaststellen of de aanwezigheid van endotoxinen in het bloed gecorreleerd is met extrahepatische verschijnselen van leverziekten, zoals stollings- en nierfunctiestoornissen, en met het beloop van de leveraandoening.
3. De gevolgen nagaan van het aanwezig zijn van een mesocavale shunt bij patiënten met een levercirrose. Als absorptie van endotoxinen uit de darm vaak optreedt, dan zullen bij deze patiënten de gevolgen van endotoxinemie vaak kunnen worden waargenomen.
4. Het nagaan of het al of niet bestaan van endotoxinemie bij leverziekten gecorreleerd is met de mate van activiteit van het RES.
5. Het bestuderen van enkele factoren die van invloed zouden kunnen zijn op de absorptie van endotoxinen uit de darm.

2 ENDOTOXINEN EN HUN EFFECTEN

Inleiding

De naam "endotoxine" werd voor het eerst gebruikt door Richard Pfeiffer in 1892 voor een toxine van cholera-vibrionen dat deel uitmaakte van de bacteriecelwand. Dit in tegenstelling tot het krachtige "exotoxine" dat deze bacteriën ook produceren (Munford 1978). *Exotoxinen* worden niet alleen door cholera-bacteriën, maar ook door andere bacteriën geproduceerd en worden tijdens het leven afgescheiden. Exotoxinen zijn eiwitten en geven aanleiding tot productie van antilichamen die men antitoxinen noemt, b.v. difterietoxine, tetanustoxine. *Endotoxinen* daarentegen zijn bestanddelen van de celwand van gram-negatieve bacteriën en komen vrij bij autolyse van deze organismen. In tegenstelling tot deze oorspronkelijke beschrijving van Pfeiffer kunnen endotoxinen mogelijk ook vrijkomen uit levende (zich vermenigvuldigende) bacteriën (Jorgensen en Smith 1974, Munford 1978). Het feit dat alleen gram-negatieve bacteriën endotoxinen doen ontstaan berust op de opbouw van de celwand van deze bacteriën. Gram-positieve bacteriën hebben in tegenstelling tot gram-negatieve bacteriën een dikke peptidoglycaanlaag en geen lipopolysacchariden-laag. De opbouw van de celwand van een gram-negatieve bacterie is schematisch weergegeven in figuur 1.

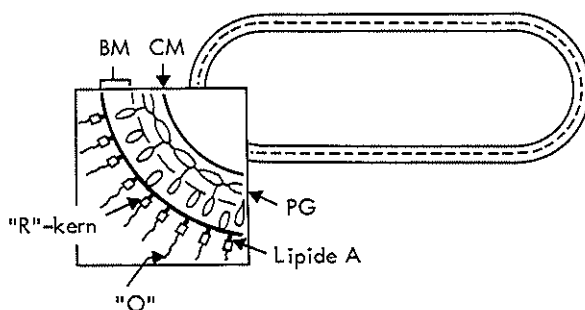


Fig. 1. Vereenvoudigd schema van een dwarsdoorsnede van de celwand van een gram-negatieve bacterie. De wand bestaat uit 3 lagen: een cytoplasmamembraan (CM), een peptidoglycaanlaag (PG), en de buitenmembraan (BM) met lipopolysaccharide dat uit 3 delen bestaat nl. het lipide A, de R-kern en het O-polysaccharide.

Chemische samenstelling van endotoxinen

Endotoxinen bestaan voornamelijk uit lipiden en polysacchariden met verder een laag gehalte aan peptiden. Over de opbouw van deze lipopolysacchariden bestaan meerdere goede overzichtsartikelen, zoals van Nowotny 1969, Galanos 1975, Riet-schel en Lüderitz 1975, Elin en Wolff 1976 en Kabir e.a. 1978.

Het lipopolysaccharide-molecuul bestaat uit drie delen, nl.: het lipide-gedeelte (hydrofoob), de R-kern en het O-polysaccharide-gedeelte (hydrofiel). Het eiwitvrije lipopolysaccharide-complex bestaat voor 60 tot 85% uit polysaccharide en ongeveer 15 tot 40% uit lipide (Westphal 1975, Galanos e.a. 1979).

Het lipide-gedeelte

Zure hydrolyse van lipopolysaccharide geeft een lipide-precipitaat, aanvankelijk geduïd als fractie A, later lipide A, en een opgeloste fractie B, die de polysacchariden bevat. De basisstructuur van het lipide in het precipitaat is een diglucosamine-eenheid die vetzuren bevat vastzittend aan amino- en hydroxylgroepen (zie figuur 2). De vetzuren hebben een ketenlengte van C10 tot C22. Het vetzuur dat meestal in hoogste concentratie gevonden wordt is β -hydroxymyristinezuur dat uniek schijnt te zijn voor het lipopolysaccharide-molecuul (Elin en Wolff 1976). Verder worden aangetroffen de vetzuren palmitinezuur, myristinezuur en laurinezuur. De diglucosamine-eenheden zijn met elkaar verbonden door pyrofosfaatbruggen. De structuur van lipide A is gelijk bij Enterobacteriaceae. Het lipide-gedeelte verbindt het lipopolysaccharide-molecuul aan de buitenzijde van de celwand met de gramnegatieve bacterie.

De R-kern

De R-kern is het middengedeelte van het lipopolysaccharide-molecuul en verbindt het lipide-gedeelte met het O-polysaccharide-deel. Het onderzoek naar de structuur van de R-kern werd vergemakkelijkt door mutante bacteriën, genaamd R of ruwe vormen, waarbij het O-polysaccharide ontbreekt. Deze bacteriën zijn gemakkelijk te herkennen door hun ruwe kolonievorm, in tegenstelling tot de S ofwel gladde (smooth) bacteriesoorten, die wel het O-polysaccharide-deel bevatten. Chemische analyse van de R-kern levert monosaccharide-eenheden op waaronder glucose, galactose en glucosamine en verder een heptose en 2-keto-2-deoxyoctonaat. Het kern-oligosaccharide is groepsspecifiek d.w.z. b.v. bij *Salmonella* is de volgorde van koolhydraatmoleculen identiek en bij lipopolysacchariden van andere bacteriegenera is het verschillend.

Het O-polysaccharide

De O-polysaccharide-structuur bepaalt de O-antigene specificiteit van de bacterie. Biochemische analyse van het O-polysaccharide laat een regelmatige opeenvolging van suikers zien. De repeterende volgorde kan lineair zijn of vertakt.

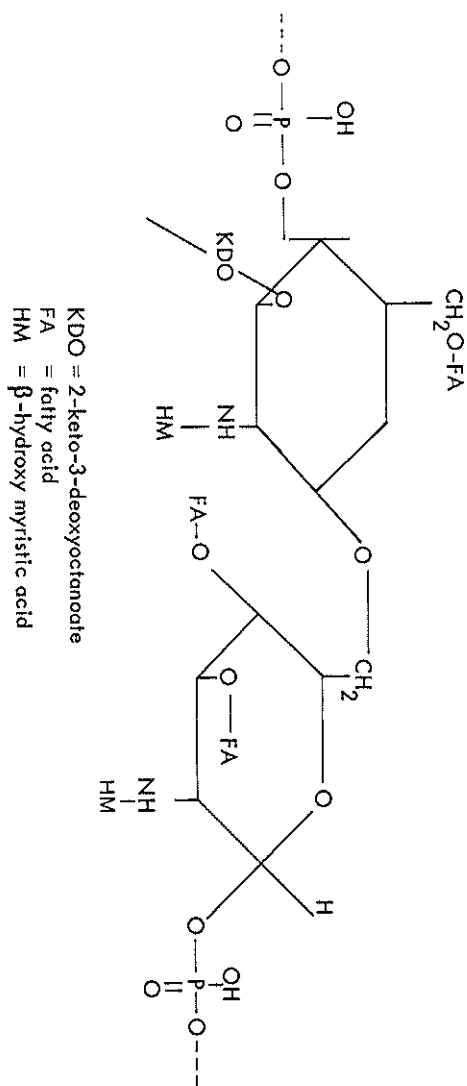


Fig. 2. Basiseenheid van het lipide A. De diglucosamine-eenheden zijn met pyrofosfaatbruggen aan elkaar verbonden. Het KDO van de R-kern verbindt het lipide A met het verdere lipopolysaccharide-molecuul.

De lengte en de samenstelling van deze repeterende eenheden varieert van stam tot stam, zoals b.v. voor verschillende typen *E. coli*.

Enkele chemische kenmerken van een lipopolysaccharide

De exacte samenstelling van het lipopolysaccharide-macromolecuul is mede

afhankelijk van de gevolgde isolatieprocedure uit de bacteriën. Meestal wordt bij de isolatie de trichloorazijnzuurmethode van Boivin e.a. (1933) of de phenolwater-methode van Westphal e.a. (1952) gebruikt. Lipopolysaccharide bevindt zich in de buitenmembraan van bacteriën in nauwe relatie met eiwitten van de celwand (Van Alphen 1979). Bij de eerste methode wordt het lipopolysaccharide verkregen in complexvorm met eiwit, waarvan het gehalte varieert tussen 10 en 20%. De tweede methode geeft lipopolysaccharide in een betrekkelijk zuivere vorm met een laag eiwitgehalte van minder dan 1% (Galanos 1975).

De extractie van het R vorm lipopolysaccharide (incompleet lipopolysaccharide) dat meer lipofiel is, geschiedt met de phenol-chloroform-petroleum-ether-methode waarbij lipopolysaccharide met verwaarloosbaar eiwitgehalte verkregen wordt (Galanos 1975). Andere extractie-methoden zijn die met EDTA of butanol (Leive en Morrison 1972). Voor een verder overzicht van extractie-technieken zie Kabir e.a. 1978.

De opbrengst aan lipopolysaccharide bij extractie van bacteriën is 1 tot 4% van het droge bacteriegewicht (Kabir e.a. 1978).

In water kunnen lipopolysacchariden aggregaten vormen, waarschijnlijk t.g.v. de hydrofobe eigenschappen van het lipide A-gedeelte. Ook vormen ze gemakkelijk complexen met andere (macro-) moleculen. Het bepalen van de molecuulmassa van het lipopolysaccharide-molecuul wordt hierdoor bemoeilijkt en verklaart de grote spreiding die in de literatuur vermeld wordt van ongeveer 10.000 tot meer dan 1 miljoen dalton (Nowotny 1969, Galanos 1975, Morrison en Leive 1975, Kabir e.a. 1978). De aggregatie-neiging van een lipopolysaccharide treedt vooral op in aanwezigheid van bivalente kationen zoals Mg^{2+} en Ca^{2+} (Galanos en Lüderitz 1975). De oplosbaarheid is groter in triëthylamine en andere organische oplosmiddelen zoals chloroform en benzeen. Ook door elektrodialyse, waarbij de kationen uit het lipopolysaccharide-molecuul verwijderd worden, ontstaat een goed oplosbaar lipopolysaccharide (Galanos en Lüderitz 1975, Galanos e.a. 1979). In het algemeen echter zijn de koolhydraatrijke S vormen van lipopolysacchariden beter oplosbaar dan de R vormen van lipopolysacchariden. De meeste lipopolysacchariden zijn oplosbaar in water of in fysiologische zoutoplossingen (Galanos 1975). Lipopolysacchariden zijn hitte-resistent en ook tamelijk resistent tegen chemicaliën (Neter e.a. 1956, Nowotny 1969, Kabir e.a. 1978).

De kennis van de morfologie van lipopolysacchariden werd verkregen door het elektronenmicroscopisch onderzoek. Lipopolysacchariden geïsoleerd uit diverse micro-organismen hebben overeenkomsten in hun structuur en gelijken op membraanfragmenten met diverse vormen zoals slingers, schijven en vesikels (Shands e.a. 1967, Shands 1973, Kabir e.a. 1978, Ruiter e.a. 1980). Ze bestaan uit een dubbellaag waarbij elke laag bestaat uit lipopolysacchariden, waarbij het lipide-deel van de beide lagen naar elkaar toegekeerd is. De afmetingen van de diverse vormen varieert van 10-200 nm (Shands e.a. 1967, Van Alphen 1979, Ruiter e.a. 1980).

Effecten van endotoxinen

De biologische effecten van endotoxinen zijn zeer uitgebreid en er bestaan hierover dan ook zeer vele publicaties. Enkele goede overzichtsartikelen zijn van Nowotny 1969, Galanos 1975, Westphal 1975, Elin en Wolff 1976 en Kabir e.a. 1978. De endotoxinen-effecten omvatten: koorts, verandering in leuko- en trombocytenaantal, stollingsactivering, complementactivering, nierfunctiestoornissen, leverbeschadiging, stimulatie van B lymfocyten, hypotensie en shock (zie tabel 1). Enkele andere effecten kunnen zijn: metabole veranderingen, het Schwartzman-fenomeen, vaatwandbeschadiging, activering van macrofagen, en cytotoxiciteit. Ze kunnen het overlijden tot gevolg hebben.

Tabel 1. Overzicht van effecten van endotoxinen.

1. Koorts
2. Verandering in leuko- en trombocytenaantal
3. Stollingsactivering
4. Complementactivering
5. Nierfunctiestoornissen
6. Leverbeschadiging
7. Stimulatie B lymfocyten
8. Hypotensie, shock
9. Tolerantie
10. Positieve limulustest

Deze effecten worden teweeggebracht door het lipide A-gedeelte van het endotoxine-molecuul (Galanos e.a. 1975, Westphal 1975). Bij hydrolyse van het endotoxine-molecuul met zuur worden twee fracties verkregen en de activiteit van endotoxinen blijkt dan, zij het in gereduceerde mate, in het lipide-gedeelte te zitten en niet in de polysaccharide-fractie (Nowotny 1969, Westphal 1975). Endotoxinen geëxtraheerd uit R mutanten van bacteriën tonen endotoxinen-activiteit ook na afsplitsing van de oligosacchariden van de R-kern (Rietschel 1975, Westphal 1975). Een complex bestaande uit het lipide A en runder serumalbumine doet effecten ontstaan die ook met het gehele endotoxine-molecuul veroorzaakt kunnen worden, inclusief de, in het volgende hoofdstuk te beschrijven, limulustest (Galanos e.a. 1972, Yin e.a. 1972).

Alvorens in het hiernavolgende op enkele recent beschreven gegevens over de effecten van endotoxinen in te gaan, dient vermeld te worden dat de effecten na toediening aan proefdieren van endotoxinen bereid uit diverse bacteriën verschillen (Greisman en Hornick 1969, Cooper e.a. 1971, Elin e.a. 1976, en verder tabel 2 in hoofdstuk 3). Ook is de mate waarin een proefdier reageert op endotoxinentoediening niet gelijk, ook niet als deze dosering omgerekend wordt naar hoeveelheid endotoxinen per kilogram lichaamsgewicht.

In het algemeen is de mens erg gevoelig voor endotoxinen en zelfs gevoeliger dan konijnen (Keene e.a. 1961, Greisman en Hornick 1969, Wolff 1973), terwijl ratten en rhesusapen nogal resistent zijn voor endotoxinen (Sheagren e.a. 1967, Filkins 1970). Voorts dient vermeld te worden dat het merendeel der gegevens van de activiteiten van endotoxinen berust op dierexperimenteel werk en op in vitro onderzoek. Bij de proefdierexperimenten bestudeert men meestal gedurende enkele uren de gevolgen van een eenmalige "bolus"-toediening. Het scala van biologische effecten van endotoxinen treedt niet bij elke dosis tegelijk op. Koorts treedt b.v. bij lage dosis op en bij hogere dosis treden hypotensie en letaliteit op.

Koorts

Na intraveneuze toediening van zeer kleine hoeveelheden endotoxinen ontstaat koorts. Bij de mens ontstaat één à twee uur na toediening verhoging van temperatuur (Keene e.a. 1961, Elin en Wolff 1976). De lengte van de latente periode is dosis-afhankelijk. De duur van de koorts is ook dosis-afhankelijk en bedraagt gewoonlijk niet meer dan drie tot vier uur. De koortscurve bij het konijn kan twee pieken vertonen, bij de mens echter is die curve monofasisch (Keene e.a. 1961, Greisman en Hornick 1969, Wolff 1973). De hoeveelheid endotoxinen die in het algemeen bij de mens koorts doet ontstaan is slechts één of enkele nanogrammen per kilogram lichaamsgewicht (Ollodart e.a. 1967, Greisman en Hornick 1969, Wolff 1973).

Het ontstaan van koorts na een endotoxine-injectie ofwel het pyrogene effect, verloopt via eenzelfde mechanisme als dat van andere pyrogenen zoals b.v. virussen, etiocholanolon en sommige medicamenten. Deze exogene pyrogenen doen uit leukocyten een endogeen pyrogeen vrijkomen, een eiwit met een molecuulmassa van bijna 15.000 (Elin en Wolff 1976, Dinarello en Wolff 1978, Bernheim e.a. 1979). Behalve leukocyten kunnen ook andere fagocyterende cellen endogeen pyrogeen produceren, zoals Kupffercellen, sinusoidale cellen in de milt en alveolaire en peritoneale macrofagen (Dinarello en Wolff 1978, Bernheim e.a. 1979). Koorts ontstaat door interactie van het endogene pyrogeen met receptoren op of bij thermosensibele neuronen in het thermoregulatiecentrum van de voorste hypothalamus. Van de voorste gaat via de achterste hypothalamus informatie naar het vasomotorencentrum van waaruit de sympathische zenuwvezels constrictie geven van perifere vaten, waardoor een vermindering van warmte-afgifte ontstaat (Dinarello en Wolff 1978, Bernheim e.a. 1979). Van het pyrogene effect van endotoxinen wordt gebruik gemaakt bij het onderzoek op aan- of afwezigheid van endotoxinen in een oplossing. In hoofdstuk 3 wordt hier uitvoeriger op ingegaan.

Effecten op bloedcellen

Na een eenmalige intraveneuze dosis endotoxinen ontstaat meestal een tijdelijke leukopenie, gevolgd door een granulocytose. De mate en duur van de leukopenie is dosis-afhankelijk. De leukopenie ontstaat doordat granulocyten zich ophopen aan de wand van capillairen (Ollodart e.a. 1967, Elin en Wolff 1976, Goodman e.a. 1979).

De granulocytose na de leukopenie is afhankelijk van een adequate beenmergreserve van voorlopers van granulocyten. Endotoxinen doen een toename ontstaan in "colony-stimulating factor" en kunnen daarmee dus de granulopoïese aanzetten (Elin en Wolff 1976).

Trombocytopenie kan eveneens ontstaan en berust op aggregatie van trombocyten die daarbij degranuleren. Hierbij komen vaso-actieve aminen, adenosine difosfaat en plaatjesfactor 3 vrij (Elin en Wolff 1976, Hawiger e.a. 1977).

Endotoxine kan zich binden aan leukocyten en trombocyten en waarschijnlijk bezitten deze cellen receptoren voor endotoxinen (Kabir e.a. 1978).

Effecten op de bloedstolling

Eén van de complicaties van gramnegatieve sepsis bij de mens is het frequent optreden van intravasale stolling. Endotoxinen worden beschouwd als een belangrijke oorzaak van deze stollingsstoornis. Men heeft kunnen vaststellen dat zij op twee verschillende wijzen aanleiding kunnen geven tot intravasale stolling. Ten eerste komt, door de interactie van de plaatjes met endotoxinen, plaatjesfactor 3 vrij, die, in aanwezigheid van calcium en factor V, trombine doet ontstaan. Ten tweede activeren endotoxinen rechtstreeks factor XII, ofwel de eerste component bij de intrinsieke stolling (Morrison en Cochrane 1974, Elin en Wolff 1976, Hawiger e.a. 1977).

Effecten op de hemodynamiek

De complexe interactie van endotoxinen met het cardiovasculaire systeem en het ontstaan van shock, is uitgebreid bestudeerd. Centraal daarin staan de hypotensie en de hypoperfusie met arterio-veneuze shunting en redistributie van bloed door wisselende mate van vasodilatatie en vasoconstrictie. Deze circulatiestoornissen komen tot stand door het lokaal vrijkomen van vaso-actieve stoffen zoals catecholaminen, histamine, serotonine en kinine (Cavanagh e.a. 1970, Dietzman e.a. 1973, Elin en Wolff 1976). Het ontstaan van shock door endotoxinen is tegen te gaan door toedienen van stoffen die de sympathicus-activiteit beïnvloeden (Cavanagh e.a. 1968, Dietzman e.a. 1973, Van Asperen de Boer 1978).

Effecten op de nieren

Endotoxinen kunnen aanleiding geven tot hypotensie. Hierdoor kan nierbeschadiging ontstaan. Ook kan er al een gestoorde nierfunctie ontstaan zonder dat er sprake is van bloeddrukval. Endotoxinen kunnen namelijk een verminderde nierdoorbloeding geven door een sterke vasoconstrictie van nierschorarteriën (Cavanagh e.a. 1970, Epstein e.a. 1970). Behalve dit renale vasoconstrictieve effect kunnen ook andere door endotoxinen geluxeerde effecten een rol spelen bij de nierfunctiestoornissen. Daarbij dienen genoemd te worden de endotheelbeschadiging, de fibrine-afzetting bij intravasale stolling en het vrijkomen van vaso-actieve stoffen zoals catecholaminen, serotonine en fibrinopeptiden (Wardle 1975, Wilkinson e.a. 1978b). Recent is aangetoond dat endotoxinen hun toxische effecten uit kunnen

oefenen door activering van het adenylcyclasesysteem in celmembranen zoals o.a. aanwezig in de cellen van nierglomeruli en niertubuli (Baud e.a. 1977, Kabir e.a. 1978).

Antigene eigenschappen

Het O-polysaccharide van het endotoxine-molecuul dat aan de buitenmembraan van gramnegatieve bacteriën zit geeft deze organismen hun karakteristieke serologische kenmerken. De immuunrespons op geëxtraheerde endotoxinen intraveneus toegediend verloopt karakteristiek. Na enkele dagen ontstaat een IgM-piek, die na wederom een aantal dagen gevolgd wordt door een tweede piek bestaande uit IgG en IgA (Rossen e.a. 1967, Möller e.a. 1973, Kearny en Lawton 1975). Endotoxinen doen volgens meerdere onderzoekers het aantal B-lymfocyten en de totale productie van immuunglobulinen toenemen (Möller e.a. 1973, Kearney en Lawton 1975, Elin e.a. 1976, Goodman en Sultzner 1979). Lipide A geeft eveneens aanleiding tot een immuunrespons en wel de productie van specifieke anti-lipide A antilichamen (Galanos e.a. 1971, Galanos 1975).

Complement

Endotoxinen kunnen het complementsysteem activeren (Mergenhagen e.a. 1973, Elin e.a. 1976). Deze activatie kan zowel geschieden via het klassieke als via het alternatieve systeem (Mergenhagen e.a. 1973, Morrison en Kline 1977). Bij de complementbepaling in vitro wordt gebruik gemaakt van het klassieke complement activeringssysteem, waarbij o.a. antilichamen nodig zijn. In vitro kan endotoxine zonder tussenkomst van antilichamen complement activeren en zodoende dus storen bij de complementbepaling, het zogenaamde anticomplementair effect van endotoxinen (Galanos en Lüderitz 1976). De mate waarin complement-activatie optreedt is afhankelijk van de fysische toestand van het endotoxine. Een hoge molecuulmassa c.q. veel aggregatie doet het effect sterk toenemen (Galanos en Lüderitz 1976, Freudenberg en Galanos 1978). Een aantal van de biologische effecten van endotoxinen kan door activering van complement veroorzaakt worden (Elin en Wolff 1976).

Metabole effecten

De toediening van endotoxinen aan proefdieren doet een kortdurende hyperglycemie ontstaan, meestal gevolgd door een hypoglycemie. Ook neemt het glycogeengehalte in de lever af. Het mechanisme van het ontstaan van hypoglycemie is complex en berust o.a. op een remming van de gluconeogenese (Buchanan en Filkins 1976, Elin en Wolff 1976, Hinshaw 1976). Bij ratten veroorzaken endotoxinen een flinke hyperinsulinemie door een toename van insulineproductie in de eilandjes van Langerhans (Buchanan en Filkins 1976, Filkins en Yelich 1980). Naast stoornissen in glucose-productie zijn er ook stoornissen in glucose-verbruik (Hinshaw 1976).

Endotoxinen kunnen ook een hyperlipemie doen ontstaan.

Op de eiwitsynthese kunnen de endotoxinen een stimulerend of een remmend effect hebben (Elin en Wolff 1976).

Zowel in vitro als in vivo blijken endotoxinen beschadiging van mitochondriën van de levercel te geven. De membraandoorlaatbaarheid van de mitochondriën wordt groter (Nicholas e.a. 1974, McGivney en Bradley 1979); de adenosine-trifosfaatproductie van deze organellen wordt geremd (Schumer e.a. 1970, Nicholas e.a. 1974). McGivney en Bradley (1979) toonden aan dat onder invloed van endotoxinen de activiteit van mitochondriale enzymen verlaagd is en dat die van lysosomale enzymen verhoogd is.

Het Schwartzman-fenomeen

Wanneer endotoxine bij een konijn intracutaan wordt ingespoten ontstaat er ter plaatse een geringe ontstekingsreactie. Indien 24 uur later een gelijke hoeveelheid van hetzelfde of een ander endotoxine intraveneus wordt geïnjecteerd, ontstaan op de plaats van de intracutane inspuiting na enkele uren petechiën die weer enkele uren later zijn samengevloeid tot grote hemorragiën. Deze reactie wordt de lokale reactie van Schwartzman genoemd.

De klassieke gegeneraliseerde reactie ontstaat als zowel de eerste als de tweede injectie intraveneus gegeven wordt aan het konijn. Hierdoor ontstaat een dubbelzijdige nierschorsnecrose en dikwijls ook bloedingen in andere organen zoals lever en milt. Bij dit type reactie speelt o.a. fibrine-afzetting door diffuse intravasale stolling een grote rol.

Tolerantie

Herhaalde toediening van endotoxinen aan mensen of aan proefdieren resulteert in een afname van een aantal van de biologische effecten van endotoxinen en vooral van de koortsreactie. Het preciese mechanisme van dit fenomeen, genaamd endotoxinentolerantie, is onbekend (Elin en Wolff 1976).

Aanvankelijk werd gedacht dat een toegenomen klaring van endotoxinen door het reticulo-endotheliale systeem hiervoor verantwoordelijk was, doch het bleek ook op te treden na blokkering van RES-activiteit. Overdracht van tolerantie met serum is bij konijnen mogelijk, doch immuunglobulinen lijken voor de overdraagbaarheid van het effect niet alleen verantwoordelijk (Ollodart e.a. 1967, Greisman en Hornick 1973, Wolff 1973, Elin en Wolff 1976). De tolerantie voor het pyrogene effect kan het gevolg zijn van een onvermogen van de Kupffercellen om endogeen pyrogeen te produceren (Dinarello e.a. 1968, Greisman en Woodward 1970). De aanwezigheid van antilichamen tegen endotoxinen en een versnelde klaring van endotoxinen kunnen hierbij een additionele rol vervullen (Greisman en Hornick 1973).

Overigens dient opgemerkt te worden dat pyrogeentolerantie niet een absoluut effect is; met een hogere dosis is het mogelijk weer dezelfde koortsreactie te verkrijgen (Wolff e.a. 1965).

Bescherming tegen endotoxinen-effecten

Met fluorescerende antilichamen zijn endotoxinen na parenterale toediening aantoonbaar in de lever. Vele studies met radio-actief gemerkte endotoxinen tonen eveneens aan dat endotoxinen snel na intraveneuze injectie naar de lever gaan (Braude 1964). Na toediening van een relatief lage dosis is meer dan 90% al na 15 minuten uit het bloed verdwenen, en is 60% van de dosis in de lever aanwezig (Herring e.a. 1963, Braude 1964). De verhouding van de hoeveelheid endotoxinen in het plasma en in de lever is afhankelijk van de toegediende dosis endotoxinen en ook van het moment na toediening waarop deze verhouding bepaald wordt (Braude 1964, Ruiter e.a. 1980). Behalve in het bloed en de lever is het gemerkte endotoxine ook te vinden in de milt en in de longen (Herring e.a. 1963, Braude 1964). In de buffy coat blijken de trombocyten en, in veel mindere mate, de leukocyten endotoxinen te bezitten (Herring e.a. 1963). Slechts een minimale hoeveelheid endotoxinen wordt aangetroffen in de nieren (Braude 1964).

Endotoxinen worden uit het bloed verwijderd door het RES (Braude 1964, Nowotny 1969, Nolan 1975). Het is dan ook niet verrassend dat de meerderheid van de geïnjecteerde hoeveelheid endotoxine teruggevonden wordt in lever en milt die samen 85 tot 95% van de fagocytair capaciteit van het RES bezitten (Braude 1964, Saba 1970). Bij beschadiging van de werking van het RES, zoals door shock of door een blokkerende stof, wordt aanzienlijk minder endotoxine opgenomen door het RES (Braude 1964, Nolan 1975). Bij endotoxinen-tolerantie bestaat er meestal een versnelde verdwijning van endotoxinen uit het bloed (Braude 1964, Starzecki e.a. 1967, Elin en Wolff 1976).

De inactivatie van endotoxinen geschiedt in het reticulo-endotheliale systeem (Farrar en Corwin 1966, Utili e.a. 1977a), maar hoe is onduidelijk. De lysosomen lijken daarbij een rol te spelen (Filkins 1971). Deze zijn overigens in de Kupffercellen van de lever in ruime mate aanwezig (Wisse 1977).

De cellen van de lever, die verantwoordelijk zijn voor de opname uit het bloed van endotoxinen, werden hierboven geduid als de RES-cellen. In het verleden werd hiervoor de Kupffercel verantwoordelijk gesteld, daar bij lichtmicroscopisch onderzoek geen verdere differentiatie in RES- c.q. sinuswandcellen van de lever te maken was. Overigens is recent met elektronenmicroscopisch onderzoek aangetoond dat endotoxinen zes uur na intraveneuze injectie zichtbaar zijn in Kupffercellen. Daarbij werden aanwijzingen gevonden voor afbraak van de gefagocyteerde lipopolysacchariden (Balis e.a. 1978, Ruiter e.a. 1980). In de nabijheid van Kupffercellen werden leukocyten aangetroffen die deels intact, deels gefragmenteerd waren zodat de door de leukocyten opgenomen endotoxinen in onmiddellijke nabijheid van Kupffercellen ter opname gereed lagen (Balis e.a. 1978). Slechts een geringe fractie van endotoxinen was aanwezig in endotheelcellen en hepatocyten. Het is mogelijk dat er een overdracht van endotoxinen via Kupffercellen naar hepatocyten plaatsvindt en dat dit pas langere tijd na toediening aantoonbaar wordt. Farrar en Corwin (1966) schrijven aan hepatocyten een detoxificerende rol toe op grond van in vitro experimenten waarbij endotoxinen geïncubeerd werden met een leverhomogenaat.

De darm als bron van endotoxinen

Ravin e.a. (1960) toonden aan dat na het toedienen van fosfor-32 gemerkte bacteriën via de maag bij konijnen 1% van de toegediende hoeveelheid antigeen van bacteriën als endotoxine in de lever aantoonbaar was. Als de proef werd herhaald na het aanbrengen van een hemorragische shock, bleek dat het bacterie-antigeen behalve in de lever ook in de milt en het bloed aanwezig was. Wiznitzer e.a. (1960), Greene e.a. (1961) en Tamakuma e.a. (1971) namen waar dat overleving bij shock afhing van het aantal gramnegatieve bacteriën dat in de darm aanwezig was. Na het opwekken van shock bij dieren met een verlaagd bacterie-aantal in de darm, ontstond er slechts in een beperkt aantal gevallen een endotoxinemie in tegenstelling tot de zeer hoge frequentie van endotoxinemie bij dieren met een normaal bacterie-aantal in de darm (Greene e.a. 1961, Tamakuma e.a. 1971). Deze en ook andere studies (Caridis e.a. 1973, Nolan 1975) tonen aan dat endotoxinen uit de darm geabsorbeerd kunnen worden en verder dat de RES-werking bij shock geremd wordt (Nolan 1975, Loegering en Saba 1976).

Effecten van endotoxinen op de lever

De acute effecten en het belang van een goed functionerend RES

Op grond van de hierboven beschreven onderzoeken blijkt dat de lever onder normale omstandigheden in aanraking komt met endotoxinen uit de darm en dat deze endotoxinen door het RES van de lever uit het portale bloed verwijderd worden.

Wolter e.a. (1978) vergeleken de klaring door de lever van endotoxinen die óf via de vena portae óf via de arteria hepatica werden toegediend. Hierbij bleek dat bij toediening via de vena portae 5x zoveel endotoxine geklaard werd als bij toediening van dezelfde dosis via de arteria hepatica. Dit verschil is te verklaren door een verschil in stroomsnelheid van het bloed in deze vaten.

Bij een gestoorde werking van het RES kan een systemische endotoxinemie ontstaan. De endotoxinen worden dan uit bloed verwijderd door o.a. de milt. Voorts kunnen de endotoxinen die in de circulatie zijn via de vena portae en arteria hepatica weer bij de lever komen. Bij de systemische endotoxinemie komen de gevolgen van endotoxinen tot uiting en daarbij kan ook de lever zelf aangetast worden. Galactosamine is een toxische stof voor de hepatocyten. Bij blokkering van lever RES ontstaat er een ernstige acute hepatitis die niet of in veel mindere mate optreedt als het RES van de lever gestimuleerd c.q. niet geremd is (Grün e.a. 1974). Bij uitbreiding van de experimenten werd een significante correlatie aangetoond tussen de mate van hepatitis en de aanwezigheid van endotoxinemie. Bij dieren die tolerant gemaakt waren voor endotoxinen en bij dieren waarbij colectomie verricht was, om daarmee de bron van endotoxinen drastisch te reduceren, ontstond geen hepatitis na galactosamine.

Grün e.a. (1976) concluderen dan ook dat endotoxinen uit de darm een grote bijdrage leveren aan het ontstaan van hepatitis door galactosamine. Een actief RES heeft daarbij een beschermende werking (Grün e.a. 1976, Grün en Liehr 1977).

Liehr e.a. beschreven in 1975 dat parenterale toediening van endotoxinen in een bepaalde dosis bij normale ratten een lichte acute hepatitis deed ontstaan. Bij ratten met portale hypertensie of een portocavale anastomose veroorzaakt een dergelijke dosis een grotere mate van acute hepatitis. Hieruit blijkt dat endotoxinen leverbeschadiging kunnen geven en voorts dat bij shunting om het RES van de lever heen het toxisch effect veel groter is.

Tetrachloorkoolstof is toxisch voor hepatocyten. Dit effect is kleiner bij tolerantie voor endotoxinen. Als de endotoxinen-neutraliserende stof polymyxine B toegevend wordt voordat tetrachloorkoolstof gegeven wordt, dan zijn de toxische verschijnselen van tetrachloorkoolstof duidelijk minder erg, te oordelen aan de mate van GPT-stijging en histologische leverafwijkingen (Nolan en Leibowitz 1978).

Effecten op langere termijn

In een fraai overzichtsartikel gaat Nolan (1975) uitvoerig in op het synergistische effect van endotoxinen en andere hepatotoxische factoren. Het betreft onderzoek uit de periode 1955 tot 1965. Een choline-deficiënt dieet doet bij ratten binnen 300 dagen een cirrose ontstaan. Na toevoeging van niet-absorbeerbare antibiotica aan het dieet waren er zelfs na 750 dagen geen significante tekenen van fibrose van de lever. Deze bevindingen, die door andere onderzoekers bevestigd zijn, tonen aan dat cirrose van de lever niet alleen door een deficiënt dieet kan ontstaan, maar dat darmbacteriën of hun toxinen daarbij eveneens betrokken kunnen zijn.

Deze verklaring kwam op losse schroeven te staan toen bleek dat levercirrose ook ontstond bij kiemvrije dieren met een choline-deficiënt dieet. De schadelijke werking die oorspronkelijk werd toegekend aan bacteriën kon worden gehandhaafd toen later aannemelijk werd gemaakt dat de cirrose veroorzaakt werd door aanwezigheid van endotoxinen in het dieet. De bescherming van chronische toediening van neomycine per os tegen het ontstaan van diëtaire cirrose bij de rat verdwijnt ook bij toevoeging van endotoxinen aan het drinkwater.

Enkele andere effecten van endotoxinen op de lever

De mate van verdwijning van intraveneus toegediend broomsulfaleïne uit het bloed is een oude en gevoelige test voor het meten van de hepatocytenfunctie. Na intraveneuze toediening van endotoxinen aan gezonde mensen treedt koorts op en verandert de broomsulfaleïne-verdwijningscurve (Blaschke e.a. 1973). Het retentiepercentage was bij 9 van de 20 personen verhoogd en bij allen was de klaring gestoord op grond van de verdwijningscurve waarbij een reflux van BSP van hepatocyten naar bloed gezien werd.

Utili e.a. (1976) beschreven dat bij perfusiestudies van de lever van de rat onder

invloed van endotoxinen een dosis-afhankelijke verlaging in galstroomsnelheid en BSP-excretie naar de gal optreedt. De perfusiestroomsnelheid heeft geen invloed op deze veranderingen. De excretie-stoornis blijkt in vitro het gevolg te zijn van een remming van het enzym natrium-kalium-adenosine trifosfatase. Dit enzym is aanwezig in de levercelmembraan bij de overgang hepatocyt naar galcanaliculus en speelt een rol bij de galexcretie (Utili e.a. 1977b). Het is aantrekkelijk te suggereren dat de cholestase die bij gramnegatieve sepsis gezien wordt, vooral bij pasgeborenen, een gevolg kan zijn van de invloed van endotoxinen op de galexcretie (Zimmerman e.a. 1979).

Effecten op de histologie van de lever

Het histologische beeld van leverbeschadiging na toediening van een grote dosis endotoxinen is uitgebreid bestudeerd met de lichtmicroscop en de elektronen-microscop (Nolan 1975, Elin en Wolff 1976, Utili e.a. 1977a, Balis e.a. 1978, Ruiter e.a. 1980).

Er ontstaat zwelling en vacuolisatie van de hepatocyten met celnecrose in het centrolobulaire gebied. Verder worden gezien: zwelling van het endoplasmatisch reticulum en de mitochondriën en glycogendepletie. Er is een toename in aantal en grootte van lysosomen in de Kupffercellen en, waarschijnlijk ook, in de hepatocyten. In de sinusoiden worden al dan niet gefragmenteerde leukocyten gezien en tevens trombi van bloedplaatjes en fibrineneerslagen. In de Kupffercellen, de leukocyten en in geringere mate in de hepatocyten worden endotoxinenstructuren gezien.

Endotoxinen en leverziekten bij de mens

Uit de hierboven beschreven literatuurgegevens blijkt dat er bij proefdieren duidelijke aanwijzingen zijn dat uit de darm endotoxinen opgenomen kunnen worden. Bij de eliminatie van de geabsorbeerde endotoxinen speelt de lever een belangrijke rol. Bij beschadiging van de lever (zie fig. 3) ontstaat een systemische

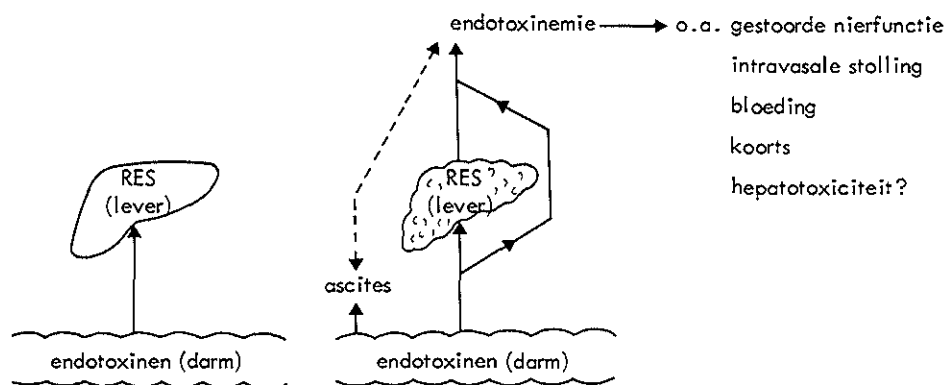


Fig. 3. Schematische voorstelling van de gevolgen van endotoxinen-absorptie bij een normale lever (links in de figuur) en bij een zieke lever (rechts in de figuur).

endotoxinemie, waarbij een scala van endotoxinen-effecten gezien wordt, die ook optreden na parenterale toediening van endotoxinen. De lever lijkt dus onder normale omstandigheden een effectieve barrière te vormen tegen een invasie van endotoxinen uit de darm.

De problemen die bij leverziekten bij de mens optreden, zoals stollingsstoornissen, bloedingen, nierfunctiestoornissen en hypotensie, gelijken op die van endotoxinen-toediening (Nolan 1975, Van Vliet 1979). Sedert enkele jaren is het mogelijk endotoxinen in bloed in vitro te bepalen met de limulustest (Levin e.a. 1972, Cooperstock e.a. 1975, zie hoofdstuk 3). Ook bij de mens blijken endotoxinen uit de darm te kunnen worden geabsorbeerd (Jacob e.a. 1977). Recent zijn enkele publicaties verschenen, waaruit blijkt dat leverziekten bij de mens gepaard kunnen gaan met endotoxinemie (Wilkinson e.a. 1974, Clemente e.a. 1977, Van Vliet e.a. 1980). Hierop wordt uitvoeriger ingegaan in de hoofdstukken 5, 6 en 7 van dit proefschrift.

3

ENDOTOXINENBEPALING

Voor het aantonen van endotoxinen wordt gebruik gemaakt van één van de vele biologische effecten die endotoxinen hebben. Voor de bepaling van endotoxinen zijn zowel in vivo als in vitro methoden ontwikkeld. Sinds de recente beschrijving van de in vitro methode door Levin en Bang (1968) worden de in vivo methoden minder frequent gebruikt. Alvorens de ontwikkeling en verfijning van de in vitro methode te beschrijven zullen de in vivo methoden besproken worden.

In vivo methoden

Hiervoor staan ter beschikking (zie tabel 2): de pyrogeentest bij konijnen, de letaliteitsbepaling bij b.v. ratten of muizen of kippe-embryo's, de letaliteitsbepaling bij ratten na een behandeling met lood, of bij muizen na voorbehandeling met actinomycine D of adrenalectomie, de huidtest bij konijnen en de bepaling van serumijzergehalte na endotoxinentoediening.

De konijnenpyrogeentest

Bij deze test wordt gebruik gemaakt van het gegeven dat na parenterale toediening van endotoxinen aan konijnen koorts ontstaat. Deze koortsreactie wordt gemeten en uitgezet in een grafiek. Hierbij wordt aan 1° C en 1 uur elk een waarde van 2,54 cm (1 inch) toegekend. Het oppervlak van het koortspatroon boven het uitgangsniveau kan dan worden berekend. De hierbij verkregen waarde in cm² wordt de koortsindex genoemd en is dus een maat voor hoogte en duur van de koortsreactie. De koortsreacties van het konijn op een aantal doseringen endotoxinen variërend van minimaal pyrogeen tot letaal werden bepaald door Keene e.a. (1961). Voor endotoxinen van *Serratia marcescens* en *Salmonella* ging het om waarden tussen 0,1 tot 100 µg per dier. De uiteinden van deze dosis-reactie curve waren betrekkelijk vlak, terwijl tussen 1 tot 20 µg per dier de verhouding van dosis en koortsreactie constant was.

Om de koortsreactie van een konijn op endotoxinentoediening te meten kan gebruik gemaakt worden van de volgende parameters (Keene e.a. 1961, Wolff e.a. 1965):

- a. de minimale dosis nodig om de temperatuur 0,6° C te doen stijgen,
- b. de minimale dosis nodig om een koortsindex van 40 cm² te verkrijgen; deze waarde valt in het rechtlijnige deel van de dosisreactie curve,
- c. de koortsindex in een tijdsbestek van 5 of 7 uur na endotoxinen-injectie.

- d. het aantal graden boven het uitgangsniveau op het tijdstip 3 uur na de endotoxinentoediening.

Keene e.a. (1961) toonden aan dat voor de bepaling van het pyrogene effect van endotoxinen de koortsindex een nauwkeuriger maat was dan de minimale pyrogene dosis. De uitvoering van de konijntest en de interpretatie van de uitkomsten vertonen in de diverse farmacopeeën enige verschillen (Hes van Zweden 1975, USP 1975, Nederlandse Farmacopee 1978). De gemeenschappelijke factor bij alle voorschriften is steeds de mate van optreden van koorts na toediening van een oplossing met een onbekende hoeveelheid endotoxinen.

Aan de konijntest kleven bezwaren. Gestreefd dient te worden naar zo weinig mogelijk variabiliteit veroorzaakt door het konijn zelf. Gelet dient hierbij te worden op: a. minimale vrijheidsbeperking van het dier, b. adequate training van het dier (meestal één tot twee dagen), zodat de temperatuurelektrode goed verdragen wordt, c. alvorens de test te starten het dier te laten wennen aan kooi en elektrode gedurende één tot twee uur, d. standaardisatie van leeftijd en gewicht, e. het elimineren van konijnen met afwijkende uitgangstemperatuur. Als verdere bezwaren gelden dat de test tijdrovend is en zeer veel ervaring vereist. De totale proefduur inclusief de voorbereiding neemt een niet geringe hoeveelheid tijd in beslag. Bovendien mogen de konijnen bij het uitblijven van een koortsreactie gedurende drie dagen en bij het optreden van een geringe koortsreactie gedurende drie weken, niet gebruikt worden. Konijnen die in hun groep een gemiddelde respons groter dan 1,2° C hebben gegeven mogen nooit meer gebruikt worden voor de pyrogeentest. Het is gebleken dat elk testdier tolerant kan worden voor endotoxinen. Dit betekent dat een hernieuwde toediening van endotoxinen een verminderde koortsreactie doet ontstaan (Elin en Wolff 1976). Op grond van bovenstaande voorzorgen en bezwaren is het duidelijk dat de konijntest niet ideaal is, en er zijn dan ook gedurende de afgelopen twintig jaar een aantal andere methoden voor de bepaling van endotoxinen voorgesteld. In het kort zullen nu nog enkele andere in vivo methoden besproken worden.

Andere in vivo methoden

a. De letaliteitsbepalingen

Een veel gebruikte methode voor het aantonen van de aanwezigheid of activiteit van endotoxinen is het vaststellen van de letaliteit bij proefdieren binnen 24 of 48 uur na toediening van een proefmonster. De daarbij gehanteerde maat is meestal de dosis waarbij 50 of 100% van de dieren (LD 50 of 100) binnen de gestelde tijd overlijdt (Braude 1964).

Van deze bepaling zijn verder nog een drietal varianten aanwezig.

1. *De kippe-embryotest.* Endotoxinen zijn onder bepaalde experimentele condities dodelijk voor het kippe-embryo. Dit letale effect is met name uitgesproken bij een embryo van 10 dagen (Smith en Thomas 1956).

2. De combinatie met *loodacetaat*. Selye e.a. toonden in 1966 aan dat ratten aanzienlijk gevoeliger gemaakt kunnen worden voor endotoxinen door een gelijktijdige intraveneuze injectie met loodacetaat. De gevoeligheid voor endotoxinen neemt volgens deze auteurs toe met een factor 100.000 maal. Filkins (1970) vond een gevoeligheidstoename van slechts 2.000 maal. De oorzaak van het effect van loodacetaat, dat overigens niet bij andere zware metalen wordt waargenomen, is niet goed bekend (Selye e.a. 1966, Munford 1978). Blokkering van het RES, zoals bijvoorbeeld door middel van thorotrast, geeft geen gevoeligheidstoename van deze orde van grootte (Selye e.a. 1966).
3. *De actinomycine D test*. Pieroni e.a. (1970) stelden vast dat bij gelijktijdige injectie bij muizen van actinomycine D en endotoxinen, de dosis endotoxinen 100.000 keer lager kon zijn om hetzelfde letale effect te bereiken (LD 50). Dit effect van actinomycine D werd niet of in veel geringere mate gezien bij combinatie met andere toxinen zoals tetanus- en difterie-exotoxine.

b. De serumijzerbepaling

Kampschmidt en Schultz toonden in 1961 aan dat een injectie met *E. coli* endotoxine bij de rat een significante daling van serumijzer gaf. Dit effect was maximaal 8 tot 16 uur na de injectie (Kampschmidt en Upchurch 1962). De mate van daling van het serumijzer was dosis-afhankelijk. Baker en Wilson (1965) deden dezelfde waarneming bij muizen en gebruikten dit effect voor een bio-assay van endotoxinen.

c. De huidtest

In 1970 beschreven McGill e.a. een bio-assay voor endotoxinen die berust op het feit dat bij intraveneuze endotoxinentoediening en intradermale adrenalinetoediening bij konijnen een hemorragische necrose op de plaats van de intradermale injectie ontstaat. De achtergrond hiervan is de eigenschap van endotoxinen om de gevoeligheid van kleine bloedvaten te vergroten voor adrenaline, zodat adrenaline in aanwezigheid van endotoxinen een krachtig necrotiserende stof wordt (Smith en Thomas 1956).

De gevoeligheden van de diverse in vivo methoden staan vermeld in tabel 2.

De genoemde in vivo methoden hebben nadelen. Er zijn proefdieren nodig met als gevolg ook faciliteiten voor de verzorging van deze dieren. Ook zijn de in vivo methoden in het algemeen tijdrovend en kostbaar. Verder zijn de in vivo methoden nogal ongevoelig en kunnen de uitkomsten beïnvloed worden door variabiliteit in de proefdieren. Een methode waarbij deze bezwaren niet of in mindere mate gelden is de hieronder te beschrijven in vitro methode.

Tabel 2: Vergelijkende waarden van gevoeligheden van bio-assays van endotoxinen.

endotoxine	parameter	dosis in μ /dier	auteur(s)
<i>S. typhosa</i>	40 cm ² koortsindex konijnen	0,07	Keene e.a. 1961
<i>S. typhosa</i>	0,6° C stijging in tem- peratuur konijnen	0,003	Keene e.a. 1961
<i>E. coli</i> 0127 : B8	40 cm ² koortsindex konijnen	0,1	Wolff e.a. 1965
<i>E. coli</i> 0113	LD 50 konijnen	490	Braude 1964
Diverse species	LD 50 muizen	150	Braude 1964
<i>E. coli</i> 0127 : B8	LD 50 kippe-embryo's	0,66	Smith en Thomas 1956
<i>Sh. flexneri</i>	LD 50 kippe-embryo's	4,2	Smith en Thomas 1956
<i>E. coli</i> 026 : B6	LD 90-100 ratten	1 met lood- acetaat	Selye e.a. 1966
<i>S. enteritidis</i>	LD 100 ratten	1 met lood- acetaat	Filkins 1970
<i>E. coli</i> 026 : B6	LD 50 muizen	0,001 met actinomycine D	Pieroni e.a. 1970
<i>E. coli</i> 055 : B5 of <i>Serratia marcescens</i>	significante daling van serumijzer bij ratten	0,1	Kampschmidt en Schultz 1961
<i>E. coli</i>	50% daling van serumijzer bij muizen	0,01	Baker en Wilson 1965
<i>B. abortus</i>	50% daling van serumijzer bij muizen	1	Baker en Wilson 1965
<i>E. coli</i> 0111 : B4	intradermale bloeding bij 50% van de konijnen	0,02 met adrenaline	McGill e.a. 1970

LD 50 = letale dosis bij 50% van de dieren.

In vitro methode: de limulustest

In de farmacie en de farmaceutische industrie bestaat grote behoefte aan een methode voor het aantonen van endotoxinen in farmaceutische producten. Tot voor kort werd daarvoor voornamelijk de pyrogeentest bij konijnen uitgevoerd. De

laatste jaren heeft men de beschikking gekregen over een in vitro methode genaamd de limulustest. Een overzicht van de achtergrond en de verdere ontwikkeling van de limulustest die in 1968 door Levin en Bang werd beschreven zal hieronder gegeven worden. Deze test is in 1977 door de Food and Drug Administration in Amerika goedgekeurd als alternatief voor de pyrogeentest bij konijnen (Randolph 1977, Mills 1978). De konijnenpyrogeentest werd in 1942 ingevoerd voor het onderzoek naar aanwezigheid van endotoxinen in farmaceutische producten (Mills 1978).

Naamgeving

De naam van de in vitro test, limulustest, is ontleend aan het dier waarvan het testmateriaal afkomstig is, namelijk de *Limulus polyphemus* ofwel degenkrab. De degenkrab is één van de oudste diersoorten. De *Limulus polyphemus* is de bekendste van de vijf soorten degenkrabben en leeft in zee-engten, baaien en riviermondingen aan de Atlantische kust van de Verenigde Staten tot aan de Golf van Mexico. Op sommige plaatsen zijn ze zo talrijk, dat ze een ernstige bedreiging vormen voor de mosselbedden aan de kust.

Het ontstaan van de limulustest

Het bloed van de degenkrab bevat slechts één celsoort en wel de amoebocyt, en deze bloedcel is beladen met granulae. Een infectie met gramnegatieve bacteriën bij, of het toedienen van endotoxinen aan de *Limulus* veroorzaakt een beeld van intravasale stolling met amoebocytopenie en onstolbaarheid van het bloed (Bang 1956). Onderzoek naar het stollingsmechanisme bij de *Limulus* toonde aan dat bloed afgenomen bij de *Limulus* snel een aggregaat van amoebocyten doet ontstaan. Hierna schrompelen de geaggregeerde amoebocyten en degranuleren de cellen, waarbij de cellen oplossen (Levin en Bang 1964a, 1964b). Deze oplossing vormt een gel onder invloed van endotoxinen en wordt daarom pre-gel genoemd.

De bloedstolling bij de *Limulus* geschiedt uitsluitend door de amoebocyten, het plasma speelt daarbij geen enkele rol (Levin en Bang 1964b). De morfologie van de amoebocyten bij de bloedstolling lijkt op die van de trombocyten, en de omzetting van pre-gel naar gel lijkt op fibrinevorming (Levin en Bang 1964a). In 1968 publiceerden de onderzoekers Levin en Bang verdere details van de reactie tussen amoebocyten en endotoxinen. Deze publicatie is de basis voor de in vitro bepaling van endotoxinen: de limulustest.

De limulustest

Door amoebocyten te lyseren (b.v. osmotisch, mechanisch, bevriezing), verkrijgt men het benodigde substraat voor de limulustest. Dit lysaat bevat de stollings-eiwitten (Levin en Bang 1968). In gelyophiliseerde vorm is dit substraat door diverse firma's op de markt gebracht. De tijdsduur tussen het toevoegen van endotoxinen aan het lysaat en het ontstaan van toename in viscositeit is groter bij een lagere concentratie aan endotoxinen (Levin en Bang 1964a, 1964b, 1968, Levin e.a. 1970).

Endotoxine in concentratie van 0,005 $\mu\text{g/ml}$ geeft nog een duidelijke gelvorming binnen twee uur na toevoeging aan het lysaat. De toevoeging van heparine en natriumcitraat aan het mengsel stoort de gelvorming niet. De reactie wordt wel geblokkeerd door EDTA, zelfs na toevoeging van calcium- of magnesiumionen. De test wordt uitgevoerd door toevoeging van 0,1 ml endotoxinen-oplossing aan 0,1 ml lysaat. De reactiesnelheid tussen lysaat en endotoxine is temperatuur-afhankelijk en is bij 37° C groter dan bij 22° C; het pH-optimum van de reactie ligt in het gebied 6,8 en 7,5 (Levin e.a. 1970); de incubatietijd die gebruikt wordt varieert, meestal wordt 1 en/of 24 uur geïncubeerd. Als positieve uitslag beschouwden Levin en Bang (1968) het ontstaan van een vaste gel, een duidelijke toename in viscositeit of het ontstaan van macroscopische vlokken.

Biochemische basis voor de limulustest

Het biochemische mechanisme dat aanleiding geeft tot de gelvorming bij de limulustest heeft vele onderzoekers beziggehouden. De reactie tussen endotoxinen en limuluslysaat is door Levin en Bang (1964a) als enzymatisch geduid. Dit is later door andere onderzoekers bevestigd (Tai e.a. 1977, Mills 1978). Het blijkt dat er vier factoren voor de reactie nodig zijn. Drie ervan zijn aanwezig in het lysaat, namelijk een stollingsactiverend pro-enzym (mol. massa 150.000 dalton), het stollingseiwit coagulogen (mol. massa 24.500 dalton) en calciumionen. De reactie wordt in gang gezet door omzetting van het stollingsactiverende pro-enzym in een actieve vorm door endotoxinen in aanwezigheid van calciumionen (zie fig. 4). Dit geactiveerde enzym splitst het stollingseiwit in drie polypeptiden subeenheden, nl. A, B en C. De eerste twee daarvan zijn niet oplosbaar en vormen door middel van disulfidebruggen het stolsel (Tai e.a. 1977, Mills 1978). Het stollingseiwit coagulogen is waarschijnlijk een "primitieve" vorm van fibrinogeen (Tai e.a. 1977). Yin e.a. (1972) toonden aan dat het lipide A gedeelte van het endotoxine-macromolecuul een positieve limulustest geeft.

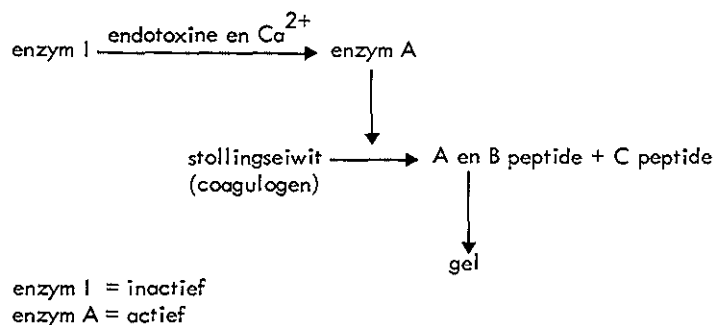


Fig. 4. Schematische voorstelling van het stollingssysteem dat aanleiding geeft tot het ontstaan van een gel bij de limulustest.

Correlatie limulustest met konijntest

De eerste vergelijkende studies over het aantonen van endotoxinen d.m.v. de limulustest en de konijntest verschenen in 1971 (Cooper e.a. 1971, Reinhold en Fine 1971). Er is een uitstekende correlatie tussen de pyrogene werking van endotoxinen in de konijntest en de gelvorming door endotoxinen in de limulustest (Cooper e.a. 1971, Elin e.a. 1976). De limulustest was bijna tien keer zo gevoelig als de konijntest (Cooper e.a. 1972). Ook andere onderzoekers kwamen tot de conclusie dat de limulustest gevoeliger is dan de konijntest (Reinhold en Fine 1971, Hes van Zweden 1975, Noordwijk en De Jong 1976, Wachtel en Tsuji 1977). De mate waarin de limulustest gevoeliger is, varieert van dezelfde gevoeligheid als de konijntest tot 300 keer zo gevoelig. Een dergelijk grote spreiding wordt veroorzaakt door verschil in limuluspreparaat geleverd door diverse fabrikanten, het verschil in soort endotoxine en mogelijk ook door het verschil in criteria, die gebruikt worden om te beslissen of een test positief genoemd wordt.

Gezien de gevoeligheid van de limulustest, de snelheid en het gemak van de bepaling, de lagere kosten in vergelijking met de konijntest en gezien het feit dat geen proefdieren nodig zijn, wordt de limulustest in toenemende mate door de farmaceutische industrie gebruikt voor het onderzoek naar aan- c.q. afwezigheid van endotoxinen.

Gevoeligheid en specificiteit van de limulustest

De beste bepalingsmethode die thans beschikbaar is voor het aantonen van endotoxinen is de limulustest (Rojas-Corona e.a. 1969, Munford 1978). De gevoeligheid ofwel sensitiviteit van de test is groot. De detectiegrens is 0,001 - 1,0 ng endotoxine per ml (Cooper e.a. 1971, Yin e.a. 1972, Rudbach e.a. 1976, Wachtel en Tsuji 1977, Van Vliet e.a. 1980). De preciese detectiegrens is afhankelijk van het soort endotoxine b.v. uit *E. coli* of *Klebsiella* en van het merk lysaat van de limulustest dat commercieel verkrijgbaar is.

Bij deze test dient uiteraard met pyrogeenvrij materiaal gewerkt te worden. De limulustest is negatief met gist-extracten (Jorgensen en Smith 1973). Levende gram-negatieve bacteriën kunnen een positieve limulustest geven, doch levende grampositieve micro-organismen doen dit niet (Reinhold en Fine 1971, Wildfeuer e.a. 1974).

Peptidoglycaan geïsoleerd uit celwanden van diverse grampositieve organismen geeft wel een positieve reactie, echter de concentratie van peptidoglycaan nodig voor een positieve limulustest is 1.000 tot 400.000 keer groter dan die van endotoxinen (Reinhold en Fine 1971, Wildfeuer e.a. 1974, Munford 1978). In 1973 deelden Elin en Wolff mee dat trombine, tromboplastine en polynucleotiden een positieve limulustest kunnen geven. Yin (1975) toonde echter aan dat trombine zelf geen positieve limulustest geeft en dat bij de bereiding van trombine contaminatie met endotoxinen gemakkelijk optreedt. Ook Reinhold en Fine (1971) meldden een negatieve limulustest met trombine.

Bij het aantonen van endotoxinen in bloed zijn speciale voorzorgen nodig, omdat in plasma remmers van de stollingsreactie die bij de limulustest plaatsvindt aanwezig zijn (Levin e.a. 1970, Reinhold en Fine 1971). De remming berust waarschijnlijk op binding aan eiwit van één of meer bestanddelen die bij de stollingsreactie betrokken zijn (Levin e.a. 1970a). Ook is het mogelijk dat er in bloed een protease-remmer aanwezig is (Munford 1978).

Om de reactie in bloed toch te kunnen uitvoeren zijn de volgende voorbehandelingsmethoden van plasma voorgesteld:

- a. verdunnen b.v. 1 op 10 of 1 op 100 (Levin e.a. 1970a)
- b. extractie met chloroform (Levin e.a. 1970a)
- c. pH veranderingen (Reinhold en Fine 1971)
- d. verdunnen en koken (Cooperstock e.a. 1975)
- e. extractie met een inert polymeer (Harris en Feinstein 1977).

De bespreking van deze methoden vindt plaats in hoofdstuk 4.

Toepassingen van de limulustest

Mededelingen over toepassingen van de limulustest werden gedaan voor radiofarmaca (Cooper e.a. 1971, Cooper e.a. 1972, McAuley e.a. 1974, Murata e.a. 1976), infuusvloeistoffen en medicamenten voor parenteraal gebruik (Cooper e.a. 1971, Cooper e.a. 1972, McAuley e.a. 1974, Hes van Zweden 1975, Cooper 1975, Noordwijk en De Jong 1976), sera en vaccins (Cooper e.a. 1972, Kreeftenberg e.a. 1977) en kweekmedia (Daoust e.a. 1976).

In het kort zullen hier tevens de resultaten besproken worden van de limulustest bij ziekten van de mens, met uitzondering van ziekten van de lever, die uitgebreider besproken worden in de latere hoofdstukken.

In 1970(b) beschreven Levin e.a. het optreden van endotoxinemie, gemeten met de limulustest bij patiënten met een gramnegatieve sepsis. In een uitgebreidere publicatie in 1972 beschreven zij een significant vaker optreden van hypotensie en overlijden bij patiënten met endotoxinemie in vergelijking met die zonder endotoxinemie. Bij geen van de 25 patiënten met een grampositieve sepsis was de limulustest positief. Het optreden van endotoxinemie bij ernstige gramnegatieve infecties is bevestigd door Reinhold e.a. 1972, Caridis e.a. 1972, Das e.a. 1973, Fossard e.a. 1974.

Daarentegen werd door Stumacher e.a. 1973, Martinez-G e.a. 1973, Feldman en Pearson 1974 en Elin e.a. 1975 de limulustest van beperkte waarde geacht voor de diagnostiek van een gramnegatieve sepsis. Dit verschil in waardering is door een aantal factoren te verklaren, nl. verschil in bepalingsmethoden, patiëntselectie en ook het gebruikte lysaat. Het lysaat werd door de diverse onderzoekers zelf bereid. Elin e.a. (1975) vermeldde de resultaten van de limulustest met lysaat dat op verschillende wijzen verkregen was. Zij kwamen daarbij tot een percentage waarin endotoxinemie aangetoond werd in hetzelfde bloed van dezelfde groep gramnegatieve sepsispatiënten variërend van 22,9 tot 97,9%! Bij de bereiding van

lysaat zijn speciale voorzorgen nodig (Jorgensen en Smith 1973, Sullivan en Watson 1974).

De laatste jaren echter is lysaat van gegarandeerde kwaliteit te koop. De resultaten van onderzoeken bij gramnegatieve sepsis met een dergelijk gestandaardiseerd lysaat zijn niet beschikbaar.

Voor de diagnose van gramnegatieve bacteriële meningitis is de limulustest in liquor een zeer waardevolle en betrouwbare aanwinst (Nachum e.a. 1973). Ook anderen (Cooper 1975, Ross e.a. 1975, Jorgensen en Lee 1978) komen tot dezelfde conclusie. Procedures om storende remmers te verwijderen zijn voor de limulustest van liquor niet nodig. De aflezing van de test kan reeds na 30 minuten gebeuren. Een nadeel van de limulustest is dat een grampositieve bacteriële meningitis daarmee niet gediagnostiseerd wordt (Nachum e.a. 1973, Ross e.a. 1975, Jorgensen en Lee 1978). Bij actieve ontstekingen van de darm zoals colitis ulcerosa en de ziekte van Crohn komt endotoxinemie voor (Aoki e.a. 1978, Colin e.a. 1979). Bij ernstige colitis als gevolg van *Shigella dysenteriae* gingen anemie, trombopenie en nierinsufficiëntie gepaard met endotoxinemie (Koster e.a. 1978).

Ook een gramnegatieve bacteriurie is met de limulustest aantoonbaar (Jorgensen e.a. 1973). Een bacterie-aantal in urine van groter dan of gelijk aan 10^3 is er mee aan te tonen (Jorgensen e.a. 1973, Coates 1977). In bloed is een bacterie-aantal groter dan of gelijk aan 10^3 met de limulustest aantoonbaar (Woodruff e.a. 1973, Jorgensen en Smith 1974).

Het is echter de vraag of werkelijk bacteriën worden aangetoond. Het is ook mogelijk dat de positieve test ontstaat door het tevens aanwezig zijn van endotoxinen in de urine of het bloed.

In 1977 publiceerden Karanicolas e.a. gegevens over een aseptische peritonitis-epidemie, veroorzaakt door endotoxinen aanwezig in de spoelvloeistof gebruikt bij peritoneaal dialyse.

Het feit dat de limulustest nog betrekkelijk weinig gebruikt wordt bij de diagnostiek van meningitiden, ernstige darmontstekingen en urineweginfecties, kan waarschijnlijk als volgt verklaard worden. Ten eerste zijn voor het vaststellen van de genoemde aandoeningen andere betrouwbare en al langer bestaande methoden aanwezig. Voorts heeft ook de limulustest speciale voorzorgen nodig zoals pyrogeenvrij glaswerk, lysaat van gegarandeerde kwaliteit en dergelijke.

Recente en mogelijk toekomstige ontwikkelingen van de limulustest

In 1977 beschreven Kreeftenberg e.a. een micromethode van de limulustest waarbij $20\ \mu\text{l}$ (i.p.v. $100\ \mu\text{l}$) van de te onderzoeken vloeistof getest wordt met $20\ \mu\text{l}$ (i.p.v. $100\ \mu\text{l}$) limuluslysaat. Een flinke besparing op limuluslysaat-aanschaf is het voordeel van deze micromethode. Flowers (1979) beschreef eveneens een micromethode. In hun oorspronkelijke publicatie in 1968 beschreven Levin en Bang dat gelvorming bij de limulustest gepaard gaat met veranderingen in optische dichtheid. Bij de

verdere uitwerking van de bepaling wordt het eindpunt van de gelvorming afgelezen met het blote oog. Hollander en Harding (1976) en Coates (1977) en Nandan e.a. (1977) beschreven een limulustest waarbij de verandering in optische dichtheid spectrofotometrisch wordt vastgesteld. De uitkomst dient als maat voor de aanwezigheid van endotoxinen in het testmonster.

Een limulustest waarbij een kleurindicator toegevoegd wordt die van kleur verandert bij aanwezigheid van endotoxinen is beschreven door Harada e.a. 1979, Clark e.a. 1979.

De detectiegrens bij deze recente variaties van de limulustest is overigens niet lager dan die van de reeds aanwezige methode van het limulusprincipe.

Een geheel nieuwe bepaling van endotoxinen is beschreven door Leibowitz e.a. in 1975 en 1979. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een radio-actief antilichaam opgewekt tegen een bepaald type *E. coli* endotoxine (*E. coli* 026). Deze radio-immuno-assay (RIA) is specifiek voor dat type *E. coli* endotoxine, echter de detectiegrens is slechts 1 ng/ml. Kimura (1976) beschreef eveneens een RIA. De verdere ontwikkeling van een endotoxine-RIA lijkt veelbelovend vooral als daarbij een betere en een gevoeligere bepaling verkregen wordt. Voor klinische toepassing is een bepaling die specifiek is voor slechts één enkel type endotoxine van geen betekenis. Een RIA van het gemeenschappelijk deel van alle endotoxinen zoals b.v. het lipide A zou hiervoor wel in aanmerking komen. Behalve de bepaling volgens het RIA-principe lijkt ook een bepaling volgens het ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay)-principe in de nabije toekomst tot de mogelijkheden te behoren.

4

METHODEN VAN ONDERZOEK

De volgende methoden, die gebruikt werden bij het onderzoek dat beschreven staat in de hoofdstukken 5 t/m 9, zullen worden besproken:

- a. de limulustest
- b. de meting van RES-functie
- c. de lysozymbepaling
- d. de prekallikreïne-bepaling
- e. de bereiding van chroom-51 gemerkt endotoxine
- f. de gebruikte statistische methoden.

De selectie en samenstelling van de verschillende groepen patiënten bij wie de onderzoeken plaatsvonden worden in de desbetreffende hoofdstukken genoemd.

De limulustest

Inleiding

In hoofdstuk 3 werd uitvoerig ingegaan op de bepalingsmethoden voor endotoxinen. Voor ons onderzoek werd gebruik gemaakt van de limulustest. Voor het aantonen van endotoxinen in bloed zijn speciale voorzorgsmaatregelen nodig, omdat in plasma remmers van de stollingsreactie bij de limulustest aanwezig zijn (Levin e.a. 1970a, Reinhold en Fine 1971). Deze remming berust waarschijnlijk op binding van endotoxinen aan eiwit (Levin e.a. 1970a) of op remming van de stolling in de limulustest door een in het plasma aanwezige protease-remmer (Munford 1978). Door speciale maatregelen zijn deze remmers te verwijderen. De volgende voorbehandelingsmethoden van plasma zijn voorgesteld:

- a. verdunnen 1 op 10 of 1 op 100 (Levin e.a. 1970a)
 - b. extractie met chloroform (Levin e.a. 1970a)
 - c. pH veranderingen (Reinhold en Fine 1971)
 - d. verdunnen en koken (Cooperstock e.a. 1975)
 - e. extractie met een inert polymeer (Harris en Feinstein 1977).
- Aan deze voorbehandelingen zijn nadelen verbonden. Door verdunning bestaat met name bij de aanwezigheid van kleine hoeveelheden endotoxinen kans op een valsnegatief resultaat, doordat endotoxinen na verdunning niet meer aantoonbaar zijn. De chloroform-extractie is bewerkelijk en tijdrovend (Reinhold en Fine 1971,

Cooperstock e.a. 1975) en geeft niet bij iedereen reproduceerbare resultaten (Mills 1979, persoonlijke mededeling).

Verandering van pH vereist toevoegingen en pH-metingen, hetgeen de kans op contaminatie van het monster inhoudt.

Voor ons onderzoek werd, vooral op grond van de uitvoerbaarheid en de reproduceerbaarheid, gekozen voor de techniek van Cooperstock e.a. (1975), met geringe modificaties (Dankert e.a. 1979, Van Vliet e.a. 1980). Deze veranderingen bestaan uit het 1 op 10 verdunnen van plasma met pyrogeenvrij 0,9% NaCl, gevolgd door 2 minuten koken i.p.v. respectievelijk 1 op 3 verdunnen met pyrogeenvrij water en 10 minuten koken. De criteria waarmee de uitslag van de limulustest positief of negatief genoemd wordt, varieert onder de diverse auteurs. Zo wordt onderscheid gemaakt in de mate van gelvorming en voorts in het tijdstip waarop deze bereikt wordt. De snelheid van het ontstaan van gelvorming bij de limulustest is afhankelijk van de concentratie aan endotoxinen (Levin en Bang 1968), en een uniforme incubatietijd is dan ook nodig. Aflezing geschiedt door de diverse auteurs in een tijdsbestek variërend van 1 tot 24 uur na het starten van de incubatie. Na een periode van 24 uur treden geen veranderingen meer op (Levin e.a. 1970a). De mate van gelvorming die na een incubatietijd van 24 uur gezien kan worden is in drie typen onder te verdelen:

- a. stevige gel vastzittend aan de bodem van het buisje, ook na draaien over 180°,
- b. visceuze gel die zich verplaatst bij draaien van het buisje over 45°,
- c. aanwezigheid van visceuze, grove granulae (van enkele mm).

Als één van deze drie soorten gel ontstond, dan werd bij ons onderzoek de limulustest positief genoemd. Dit komt overeen met de criteria die als regel in de literatuur worden gehanteerd. In alle andere gevallen, zoals bij verandering in helderheid van de oplossing of aanwezigheid van fijne witte korreling of het ontbreken van verandering na incubatie, werd de test als negatief geduid.

De limulustest is een kwalitatieve test, doch een indruk over kwantiteit is te verkrijgen door verdunning van het te testen monster. Het bleek tijdens het onderzoek dat een laag gehalte aan endotoxinen in een monster visceuze gelatie of granulae deed ontstaan. Bij sterk positieve monsters werd herhaaldelijk waargenomen dat bij uitverdunnen de gel van type verandert en wel van type a naar type b en c en dat bij verder verdunnen geen gelvorming meer optrad.

De gevoeligheid van de limulustest toonde een geringe variatie afhankelijk van de gebruikte batch van het limuluslysaat (Pyrogen, Mallinckrodt, Byk Nederland). Gebruikt werden de batches 8AL, 8GL en 9EX. De detectiegrens met deze batches bedroeg telkens 0,006 ng endotoxine per ml 0,9% NaCl-oplossing. Deze grens is gebaseerd op het bij het lysaat geleverde *E. coli* endotoxine.

Bij de opzet van het onderzoek naar endotoxinen in bloed bij leverziekten bleek er geen informatie te bestaan op welke termijn een plasmamonster na afname op endotoxinen nog kan worden onderzocht. Om hierover geïnformeerd te raken werd een houdbaarheidsproef verricht. Endotoxine werd opgelost in plasma tot een concentratie 25 pg/ml en opgeslagen in een koelkast bij + 4° C en een diepvries bij - 25° C. Bij wekelijkse bepaling van het endotoxine-gehalte liep de concentratie van

het endotoxine in plasma in de koelkast duidelijk terug en was na 4 weken niet langer aantoonbaar. Bij bewaren van de endotoxine-oplossing in de diepvries waren de bepalingen van endotoxine die in de eerste maanden wekelijks, vervolgens éénmaal per twee weken en na een half jaar éénmaal per maand werden verricht, een jaar na het begin nog steeds positief. De plasmamonsters van de patiënten werden vanaf het begin steeds in de diepvries bewaard en binnen 12 maanden onderzocht.

Uitvoering van de limulustest

De limulustesten werden verricht door mej. H.C.M. Maas van de afdeling Klinische Microbiologie en Antimicrobiële Therapie (hoofd: Prof. Dr. M.F. Michel). Hiervoor werd limuluslysaat (Pyrogen) van Mallinckrodt (Byk Nederland) gebruikt. Pyrogeenvrij water was afkomstig van de Apotheek van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam-Dijkzigt. Het fysiologische zout werd aanvankelijk eveneens door de apotheek zelf bereid, doch werd later betrokken bij het Centraal Laboratorium van de Bloedtransfusiedienst te Amsterdam. De benodigde spuiten en naalden waren disposabel en pyrogeenvrij. De verdere benodigheden zoals buisjes (Kimax buizen met schroefdop, Tamson), pipetten en ander glaswerk werden voor gebruik pyrogeenvrij gemaakt.

De Kimax buizen en de bijbehorende schroefdop werden gespoeld met gedestilleerd water en alcohol 96% en daarna gedurende 2 uur gedroogd in een stoof bij 180° C. Hierna werden de doppen op de buizen gedaan en werden ze na wikkelen in aluminiumfolie gedurende 4 uur bij 180° C verhit. De Kimax buizen werden eenmalig gebruikt. De pipetten en ander glaswerk werden na een nacht in een alkalische zeepoplossing te hebben gestaan (RBS 25, 5% oplossing, Hicol), gedurende 2 uur gespoeld met water en nagespoeld met gedestilleerd water en 96% alcohol. Na 2 uur drogen in de stoof bij 180° C werden ze in groepjes verpakt in aluminiumfolie en gedurende 4 uur in de stoof bij 180° C verhit.

Het bloed werd, na desinfectie van de huid met $\frac{1}{2}$ % chloorhexidine in 70% alcohol, afgenomen via venapunctie d.m.v. een pyrogeenvrije spuit met naald. Dit bloed werd in een Kimax buisje gedaan waarin zich reeds 100 E heparine (Thromboliquine) bevond. Het bloed werd gedurende 10 minuten bij 800 g afgedraaid. Het plasma werd d.m.v. een spuit naar een ander Kimax buisje overgebracht en werd óf bewaard bij + 4° C en binnen 2 x 24 uur bepaald óf ingevroren bij - 25° C voor bepaling op een later tijdstip.

Bij de limulustest (zie figuur 5) wordt 0,1 ml plasma verdund met 0,9 ml fysiologisch zout en deze 1 op 10 oplossing wordt, na mengen, gedurende 2 minuten gekookt en vervolgens afgekoeld tot kamertemperatuur. Het lyasaat werd volgens voorschrift opgelost. In een glazen testbuisje van 10 x 75 mm werd aan 0,1 ml lyasaat 0,1 ml van de voorbehandelde plasma-oplossing toegevoegd. Na 24 uur trillingvrij incuberen in een stoof bij 37° C werd de uitslag afgelezen. De test werd beoordeeld m.b.v. de hierboven vermelde criteria. Omdat de bepalingstechniek in plasma een verdunningsstap van 1 op

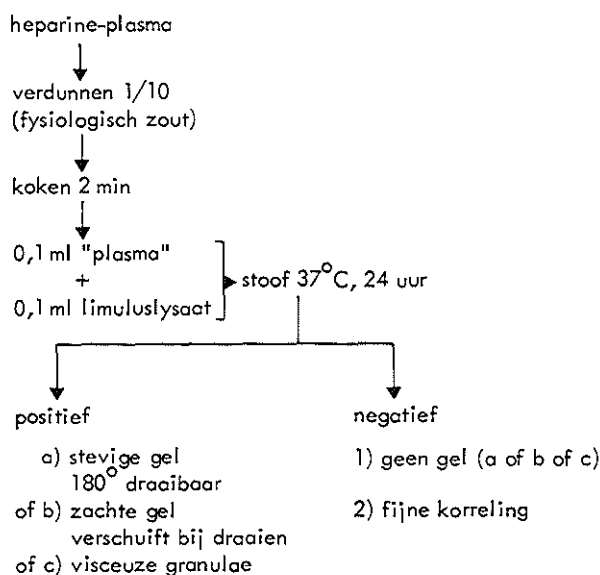


Fig. 5 Werkschema bij de limulustest.

10 vereist, verschuift de detectiegrens in deze vloeistof naar een waarde van 0.060 ng/ml plasma.

Bij elke serie bepalingen werd een positieve controle meegenomen en wel plasma van een gezonde vrijwilliger met 0,12 ng endotoxine per ml en als negatieve controle hetzelfde plasma zonder endotoxine-toevoeging en verder het gebruikte pyrogeenvrije water en fysiologisch zout. De positieve controle was steeds positief, de andere 3 oplossingen waren steeds negatief. De heparine-oplossing werd een aantal keren getest en gaf steeds een negatieve limulustest.

Bij een groep van 30 gezonde controlepersonen waren bij herhaling geen endotoxinen aantoonbaar.

De bepaling van de werking van het reticulo-endotheliale systeem

Inleiding

De verwijdering uit bloed van endotoxinen geschiedt door het reticulo-endotheliale systeem (zie hoofdstuk 2). De Kupffercellen van de lever spelen hierbij een belangrijke rol. Het optreden van endotoxinemie wordt toegeschreven aan een onvoldoende werking van het RES (Brafield 1974, Liehr en Grün 1977). Hoewel het RES van de lever 15% van het aantal cellen van de lever uitmaakt (Gates e.a. 1961) was er tot voor kort weinig belangstelling voor de functie van deze cellen (Bradfield 1974, Wisse en Knook 1977).

Radio-actief technetium-zwavel-colloïd wordt na intraveneuze toediening door

het RES, met name van de lever, gefagocyteerd (Saba 1970, Berghuis 1976, Brucer 1977). Bij chronische leverziekten vindt een veranderde opname van het colloïd plaats. Er wordt minder in de lever en meer op andere plaatsen zoals de milt en de wervelkolom opgenomen (Castell en Johnson 1966, Horisawa e.a. 1976, Huet e.a. 1980). Bij chronische leverziekten blijkt de colloïdklaring van het bloed vertraagd te zijn (DeNardo e.a. 1976, Huet e.a. 1980).

Bij het vervaardigen van een lever- en miltscan wordt 15 à 20 minuten na intraveneuze injectie van 55,5 MBq (1,5 mCi) ^{99m}TcS -colloïd een (statisch) beeld verkregen van de opname door het RES. Een dynamisch beeld van RES-werking is te verkrijgen door vóór en op meerdere tijdstippen na injectie van het radio-actieve colloïd bloed af te nemen en dan de daarin aanwezige radio-activiteit te meten. Door dit grafisch uit te zetten is daaruit een halfwaarde-tijd te berekenen als maat voor de verdwijningssnelheid. De klaring van het bloed van deeltjes is echter o.a. afhankelijk van de deeltjesgrootte. Grote deeltjes (één of meer μm) worden sneller geklaard dan kleine (enkele nm) deeltjes (Kitani en Taplin 1972, Brucer 1977).

Voor de bestudering van de fagocytose-capaciteit wordt meestal gebruik gemaakt van grote deeltjes, zoals micro-aggregaten (Brucer 1977). Het vervaardigen van albumine-micro-aggregaten is niet eenvoudig en het gelukte ons niet een constante deeltjesgrootte te verkrijgen.

Daarentegen is het vervaardigen van ^{99m}TcS -colloïd een routinetechniek. De deeltjesgrootte wordt opgegeven als 20-30 nm (Mundschenk e.a. 1971, Kitani en Taplin 1972), doch Brucer (1977) vermeldt 200-800 nm. De grootte van het endotoxine-molecuul gemeten bij elektronenmikrosopisch onderzoek bedraagt 20-200 nm (hoofdstuk 2) en komt dus redelijk overeen met de orde van grootte van ^{99m}TcS -colloïd.

Hierboven werd reeds vermeld dat endotoxinemie beschouwd wordt als een gevolg van een slechte werking van het RES. Voor ons onderzoek waren we dan ook geïnteresseerd in de snelheid van de opname van colloïd door het RES als maat voor RES-werking. Hiervoor werd een niet-bloedige methode toegepast. Munschenk e.a. (1971) vonden geen statistisch significant verschil in verdwijning van ^{99m}TcS -colloïd uit bloed gemeten op bloedige of onbloedige wijze. Bij de niet-bloedige methode wordt na injectie van ^{99m}TcS -colloïd continu de hoeveelheid radio-activiteit gemeten in de onderarm die zich bevindt in een Large Volume Liquid Scintillation Counter (Armac, Packard). Door het verloop van de gemeten radio-activiteit uit te zetten tegen de tijd krijgt men informatie over de werking van het RES.

Uitvoering

De RES-functie meting werd verricht in samenwerking met A.M. Ruis en B.L. Wemmenhove van de afdeling Nucleaire Geneeskunde (hoofd: Prof. Dr. G. Hennemann).

Het onderzoek wordt uitgevoerd bij een zittende patiënt die zijn linker hand en onderarm in een Armac (Packard) heeft. Als radio-actieve teststof wordt Technetium- 99m -zwavel-colloïd (Stercow, Byk Mallinckrodt, en Tesuloid, Squibb)

gebruikt, dezelfde stof die de laatste jaren intensief gebruikt wordt voor lever-scanning vanwege zijn gunstige isotopen-eigenschappen zoals een korte halfwaardetijd van 6 uur en het uitzenden van 0,140 MeV gammastraling (Berghuis 1976). Alvorens aan de patiënt een dosis toe te dienen, wordt gedurende 6 verzamelperioden van 10 seconden de achtergrondstraling verzameld. Dit wordt op een ponsband vastgelegd. Hierna wordt een bolus van 2,96 MBq ($80 \mu\text{Ci}$) $^{99\text{m}}\text{TcS}$ -colloïd (0,3 mg zwavel-colloïd) in 1 ml intraveneus toegediend via een grote elleboogsvene rechts. De stralingsdosis voor de lever hierbij is (volgens MIRD 3 1975) $1,3 - 2,7 \times 10^{-4}\text{Gy}$ ($13 - 27 \times 10^{-3} \text{ rad}$). Vervolgens wordt gedurende 15 minuten de straling uit de linker onderarm geregistreerd in verzamelperioden van 10 seconden. Hierna wordt de meting bij de patiënt beëindigd.

Van de ponsband leest een computer de hoeveelheid straling die iedere 10 seconden gemeten werd en die gecorrigeerd wordt voor de gemeten achtergrondstraling. Door de computer wordt het aantal counts van 3 perioden van 10 seconden gesommeerd en daaruit wordt een waarde verkregen. Deze waarden worden semilogaritmisch uitgezet (zie fig. 6). Uit de aldus ontstane curve wordt dan door de computer een

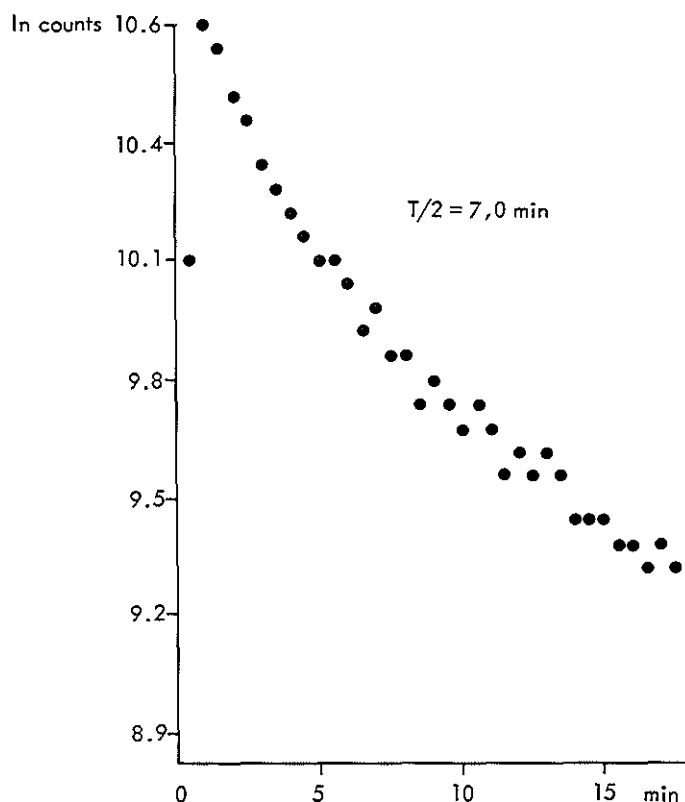


Fig. 6. Voorbeeld van een verdwijningscurve van radio-activiteit uit de linker onderarm na toediening in de vena cubiti rechts van $80 \mu\text{Ci}$ technetium-zwavel-colloïd. De uit deze curve te berekenen halfwaardetijd ($T/2$, zie tekst) bedraagt 7.0 minuten.

halfwaarde-tijd berekend in een segment van 3 minuten dat begint 1 minuut na het piekaantal counts. Met halfwaarde-tijd ofwel $T/2$ wordt bedoeld de tijd benodigd om een 50% vermindering in radio-activiteit te verkrijgen bij een verdwijning van radio-activiteit volgens de berekende lijn uit het segment van de genoemde 3 minuten-periode.

Bespreking

Bij 15 normale personen was de halfwaarde-tijd $5,92 \pm 1,55$ minuten ($\bar{x} \pm SD$). Er was geen significante correlatie van $T/2$ met de leeftijd ($r = -0,17$). Mundschenk e.a. (1971) vonden wel een geringe doch significante positieve correlatie. De halfwaarde-tijd informeert over de fagocyterende activiteit van het RES. Het grootste deel van het RES bevindt zich in de lever (Saba 1970). Verschillende factoren zoals bloed-doorstroming, aantal en functionele activiteit van de Kupffercellen spelen een rol bij de opname van colloïd door de lever (Bradfield 1974, Brucer 1977, Winkler e.a. 1979).

Doel van ons onderzoek was na te gaan of verschillen in RES-functie gepaard gaan met verschillen in het voorkomen van endotoxinemie. De gebruikte methode liet wel een uitspraak toe over de totale verwerkingscapaciteit van het RES, maar niet over de bijdrage van afzonderlijke factoren aan deze capaciteit.

De lysozymbepaling

Inleiding

De Kupffercellen of macrofagen in de lever als onderdeel van het RES, hebben een groot aantal functies (Carr 1977, Popper 1977). De langst en best bekende eigenschap is het vermogen om lichaamsvreemde deeltjes te fagocyteren. Recent werd aangetoond dat bij stimulatie van macrofagen lysozym vrijkomt zowel in vitro (Carr 1977) als bij proefdieren in vivo (Kokoshis en Di Luzio 1979). Lysozym, dat overigens ook door een aantal andere cellen, zoals monocysten en granulocyten, geproduceerd kan worden, is een enzym dat bacteriën doet lyseren. Of het lysozymgehalte in bloed bij de mens eveneens de werking van het RES weerspiegelt is niet bekend. Bij een tweetal patiëntengroepen, respectievelijk lijdende aan acute hepatitis en cirrose met een mesocavale shunt, werd onderzocht of een verhoogd lysozymgehalte gepaard ging met een verlaagde frequentie aan endotoxinemie en omgekeerd. Tevens werd onderzocht of er een correlatie bestond tussen het lysozymgehalte in plasma met de RES-werking bepaald met ^{99m}TcS -colloïd.

Uitvoering

De bepaling van lysozym in plasma werd verricht door F. den Holder van de afdeling Hematologie (hoofd: Prof. Dr. J. Abels).

Daarbij werd gebruik gemaakt van *Micrococcus lysodeikticus* als substraat

(Lysozyme Reagent Set, Worthington). Bij toevoegen van een plasmamonster aan deze celsuspensie heldert deze op. De snelheid waarmee de helderheid toeneemt is afhankelijk van de hoeveelheid lysozym in het monster. Deze verandering in helderheid wordt bij 550 nm gemeten als afname in extinctie per minuut. Door de hierbij verkregen waarde af te lezen in een curve, gemaakt met bekende hoeveelheden lysozym, wordt het lysozymgehalte in het monster verkregen.

De normaalwaarde van lysozym in plasma met deze methode was $6,05 \pm 1,63 \mu\text{g/ml}$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 20$).

De bereiding van chroom-51 gemerkt endotoxine

Inleiding

Voor het onderzoek bij dieren naar de klaring van endotoxinen door het RES werd in het verleden frequent gebruik gemaakt van radio-actief gemerkt endotoxine (Braude 1964). Ook voor absorptie-studies werd gemerkt endotoxine toegepast. Het isotoop dat meestal gebruikt wordt is chroom-51 en de techniek voor het bereiden van radio-actief endotoxine werd beschreven door Braude e.a. in 1955.

Bij andere labelingsmethoden wordt gebruik gemaakt van tritium (Tomasulo e.a. 1975), jodium-125 (Zimmerman en Kern 1977) en fosfor-32 (Ravin e.a. 1960). Bij deze laatste methode gebeurt de merking, in tegenstelling tot de andere genoemde methoden, door bacteriën te kweken in een medium met fosfor-32, waarna de endotoxinen uit de bacteriën worden geëxtraheerd.

Voor ons onderzoek werd de methode van merking met ^{51}Cr gekozen. Endotoxinen gaan met dit isotoop (halfwaarde-tijd 27,8 dagen, gammastraling 0,32 MeV) een stabiele verbinding aan (Braude e.a. 1955, Herring e.a. 1963). Als plaats van binding wordt het lipide A gedeelte genoemd (Braude 1964). De biologische activiteit gemeten d.m.v. letaliteitsbepaling (zie hoofdstuk 3) verandert niet door de binding met chroom (Braude e.a. 1955, Daniele e.a. 1970, Nolan e.a. 1977). Evenals Ruiter e.a. (1980) konden wij vaststellen dat er geen verschil was in limulustest-uitslag van gemerkt en niet-gemerkte endotoxine.

Uitvoering van de merking.

Endotoxine, *E. coli* 0127 : B 8 (Difco), werd opgelost in een fosfaatbuffer (15 mM Na-fosfaat, 2,9 mM NaCl, pH 7,4). De concentratie endotoxine was 5 mg/ml. Aan deze oplossing werd per 100 mg endotoxine 5,55 MBq (150 μCi) $^{51}\text{CrCl}_3$ (IRE Nederland) toegevoegd. Na 30 uur incuberen bij kamertemperatuur werd ethanol toegevoegd (eindconcentratie 68 volume %). Na 18 uur was er een neerslag van endotoxine aanwezig en na centrifugeren gedurende 15 minuten met 600 g werd de bovenstaande vloeistof afgepipetteerd. De pellet werd d.m.v. schudden opgelost in de toegevoegde fosfaatbuffer (20 ml). Hierna werd 50 ml alcohol toegevoegd en dagelijks weer gecentrifugeerd. De radio-activiteit van de supernatant werd in een

gammateller gemeten (LBK Ultrogamma, Wallac). De wasprocedure (aanvankelijk met 50, later oplopend tot 100 ml per keer) werd herhaald totdat in het supernatant bij herhaling minder dan 0,05% van de totale radio-activiteit van de beginoplossing teruggevonden werd. Dit was steeds na 3 tot 5 keer wassen het geval. De opbrengst aan chroom-51 label bedroeg in het aldus verkregen endotoxine circa 80%.

De opbrengst aan gemerkt endotoxine werd bepaald door colorimetrische bepaling van de koolhydraten aanwezig in endotoxinen. Voor deze suikerbepaling werd de fenol-zwavelzuur-methode gebruikt (Dubois e.a. 1956, Hirs 1976). Aan 2 ml suikerc.q. endotoxine-oplossing werd 0,05 ml 80% fenol-oplossing toegevoegd. Hierna werd 5 ml geconcentreerd zwavelzuur toegevoegd en goed gemengd. Na 15 minuten staan bij kamertemperatuur volgde 15 minuten incubatie in een waterbad bij 30° C. De karakteristieke oranje kleur die ontstond werd spectrofotometrisch gemeten bij 490 nm in een spectrofotometer (Carl Zeiss, PMQ II). Bij deze procedure werd een blanco-oplossing en verder een verdunningsreeks van een suikeroplossing van bekende concentratie als standaard meebepaald. Op grond hiervan was de concentratie suikers in de endotoxine-oplossing voor en na merking te bepalen als maat voor het gehalte aan endotoxine in de oplossing na de merking. De opbrengst aan endotoxine na merking was op grond van de colorimetrische bepaling gemiddeld 75%.

Het endotoxine werd na merking opgelost in glucose 5%. Deze stock-oplossing werd na het bekend worden van de endotoxine-concentratie verdund tot de steeds te gebruiken concentratie van 2 mg/ml. Het werd bewaard bij + 4° C of - 20° C en gebruikt binnen een maand na bereiding.

Uit de colorimetrische suikerbepaling was behalve de opbrengst aan endotoxine ook het percentage aan polysacchariden in endotoxine te bepalen op grond van de suikerbepaling in de standaardoplossing. Het percentage polysacchariden bleek 76% te bedragen en kwam overeen met de in de literatuur opgegeven percentages variërend van 60 tot 85% (zie hoofdstuk 2).

Om geïnformeerd te zijn over de grootte van het gemerkte endotoxine-molecuul werd een oplossing van gemerkt endotoxine geleid door een filter met een poriemaat van 0,22 μ (Swinnex - 13, Millipore). De oplossing passeerde volledig het filter, zodat de grootte van het gemerkte endotoxine-molecuul kleiner is dan 220 nm. Deze grootte komt overeen met de afmetingen van endotoxine gemeten via elektronenmicroscopie, nl. 20 tot 200 nm (zie hoofdstuk 2).

De prekalikreïne-bepaling

Inleiding

Een van de vele effecten van endotoxinen is het doen ontstaan van stollingsstoornissen (zie hoofdstuk 2). Morrison en Cochrane (1974) konden met gezuiverd factor XII (Hageman factor) aantonen dat endotoxinen deze eerste component van het intrinsieke stollingssysteem activeren. De interactie van endotoxinen met factor XII doet tevens prekalikreïne (Fletcher factor) activeren (zie fig. 7). Daarentegen is

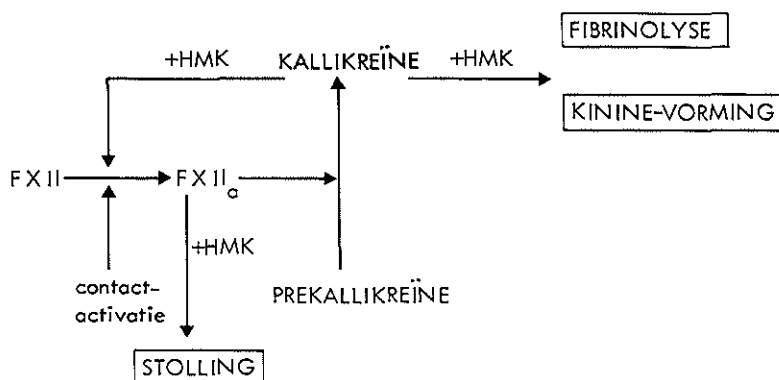


Fig. 7. Schematische voorstelling van het plasma-prekallikreïne-systeem en de gevolgen van activatie van dat systeem.
 Hoog moleculair kininogeen staat aangegeven als HMK.
 Factor XIIa is de geactiveerde vorm van factor XII.

prekallikreïne weer nodig voor activatie van factor XII, evenals hoog moleculair kininogeen (HMK, Fitzgerald factor) (Cochrane en Griffin 1979, Friberger e.a. 1979, Levinsky 1979). Kallikreïne is zelfs de krachtigste activator van Hageman factor in plasma (Levinsky 1979). Behalve dat Hageman factor de intrinsieke stolling in gang zet en prekallikreïne activeert kan het ook de fibrinolyse-cascade in gang zetten.

Robinson e.a. (1975) stelden vast dat bij 5 patiënten, van een groep van 18, na een invasief urologisch onderzoek endotoxinemie ontstond. De aanwezigheid van endotoxinen in bloed ging gepaard met een significante verlaging van de prekallikreïnespiegel in vergelijking met de spiegel voor de ingreep en ook met de spiegel bij patiënten zonder endotoxinemie.

Bij levercirrose is het plasma prekallikreïne-gehalte verlaagd (Saito e.a. 1978, Wong 1978). Het is niet bekend of deze verlaging gepaard gaat met de aanwezigheid van endotoxinen in het bloed.

De bepaling van factor XII is moeilijk en was recent nog niet voor routine onderzoek beschikbaar. Sinds kort bestond er echter wel een mogelijkheid tot het meten van activeerbaar prekallikreïne (Witt 1977, Stormorken e.a. 1978). Gezien de effecten die endotoxinen kunnen hebben op het plasma-prekallikreïne-systeem werd bij patiënten met levercirrose waarbij endotoxinen bepaald werden tevens de prekallikreïne-activatie bepaald.

Uitvoering

De prekallikreïne-activatie werd bepaald op het Hemostase Laboratorium van de afdeling Hematologie (hoofd: Prof. Dr. J. Abels) door Dr. H.H.D.M. van Vliet en W.K. Verburgh.

In het kort is het principe van de bepaling als volgt.

Aan het citraatplasma wordt bij 0° C en pH 7,8 dextraansulfaat toegevoegd om prekallikreïne te activeren. De bepaling wordt bij 0° C uitgevoerd omdat dan C₁-esterase, een belangrijke remmer van de omzetting van prekallikreïne naar kallikreïne, inactief is. Na verschillende perioden van incubatie (5, 10 en 15 minuten) wordt aan het mengsel een chromogeen substraat (S 2302, KabiVitrum) toegevoegd. Van dit substraat wordt door kallikreïne p-nitro-aniline afgesplitst. De hierdoor ontstane verandering in extinctie per tijdseenheid bij 405 nm is een maat voor de kallikreïne-concentratie en dus voor de prekallikreïne-activatie. Nadat een ijkcurve is gemaakt kan hierop de hoeveelheid (geactiveerd) prekallikreïne van het monster afgelezen worden.

De normaalwaarde na incubatie gedurende 5, resp. 15 minuten is $87,8 \pm 17,4$ resp. $85,3 \pm 22,9\%$ ($\bar{x} \pm SD$, $n = 12$).

De gebruikte statistische methoden

Bij de statistische bewerking van de vermelde gegevens werd gebruik gemaakt van de volgende methoden.

Voor het vergelijken van twee onafhankelijke groepen werd de verdelingsvrije toets van Mann-Whitney gebruikt. In situaties waarin sprake was van een lineair verband werd de kleinste kwadratenlijn en de Pearson correlatie coëfficiënt berekend. In de overige gevallen werd de Spearman correlatie berekend. Bij vergelijking van 2 frequenties werd de exacte toets van Fisher toegepast.

Wanneer in dit proefschrift over significantie gesproken wordt dan wordt daarmee statistische significantie bedoeld en deze is berekend bij tweezijdige toetsing met een onbetrouwbaarheidsdrempel $\alpha = 5\%$. Indien afgeweken is van de zojuist genoemde methoden, dan wordt dit steeds vermeld. De berekeningen werden uitgevoerd op een Wang of Hewlett Packard desk-computer.

5

RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK BIJ PATIENTEN MET ACUTE HEPATITIS

Inleiding

Endotoxinen worden geabsorbeerd uit de darm en worden uit het portale bloed verwijderd door de lever (Prytz e.a. 1976, Jacob e.a. 1977, hoofdstuk 8 van dit proefschrift). Als de lever beschadigd is kan endotoxinemie optreden. De aanwezigheid van endotoxinen in de bloedcirculatie is aangetoond bij acute leverinsufficiëntie (Wardle 1974, Wilkinson e.a. 1974). Endotoxinemie bleek gepaard te gaan met stoornissen in nierfunctie en bloedstolling en voorts met een hogere mortaliteit. Het is niet bekend of endotoxinemie voorkomt bij acute hepatitis. In dit hoofdstuk worden de gegevens beschreven van een onderzoek naar endotoxinemie bij een groep patiënten met acute hepatitis. De vraagstelling bij dit onderzoek was, komt endotoxinemie ook voor bij acute hepatitis en, indien endotoxinemie voorkomt, is er een correlatie tussen de ernst van en/of de problemen bij de hepatitis en de aanwezigheid van endotoxinemie.

Verondersteld wordt dat het onvermogen van de lever om endotoxinen uit bloed te verwijderen het gevolg is van een geremde werking van het reticulo-endotheliale systeem, van de aanwezigheid van porto-systemische shunting of van een combinatie van deze twee factoren (Bradfield 1974, Nolan 1975, Liehr en Grün 1977). Recent werd gesuggereerd dat het lysozymgehalte in serum een maat is voor de activiteit van het reticulo-endotheliale systeem (Kokoshis en Di Luzio 1979). Om deze hypothesen over RES-werking te toetsen werd bij de groep van 22 patiënten met acute hepatitis het lysozymgehalte in het bloed bepaald en voorts werd bij hen een RES-functie meting met behulp van radio-actief technetium-colloïd verricht.

Opzet en uitvoering van het onderzoek

In de periode van 1 augustus 1978 tot 1 januari 1980 werden 22 patiënten met een acute hepatitis op de afdeling Inwendige Geneeskunde II opgenomen. Van de patiënten (12 mannen en 10 vrouwen) was de gemiddelde leeftijd 36,3 jaar (spreiding van 19 tot 70 jaar). De hepatitis was bij 14 patiënten HBsAg positief. Bij 6 patiënten was de hepatitis het gevolg van het gebruik van medicamenten (2 door halothaan, 1 door paracetamol, 1 verapamil, 1 methyldopa en 1 door tuberculostatica) en bij de overige twee was bij de ene de oorzaak hepatitis A en bij de andere ischemie.

Bij alle patiënten werd bloed afgenomen op dag 2, 5 of 6 en 8 (dag 1 is de dag van opname) voor bepaling van trombocyten- en leukocytenaantal, creatinine, bilirubine, transaminasen (GOT, GPT) en endotoxinen. Bij de meeste patiënten werden deze bepalingen na de eerste week twee keer per week voortgezet tot ontslag. Bij opname kreeg de patiënt 5 mg vitamine K parenteraal toegediend en werd de volgende dag een stollingsonderzoek verricht.

De endotoxinen werden bepaald zoals beschreven in hoofdstuk 4. Tijdens de eerste week van opname werd bij 8 patiënten een meting van RES-functie verricht (zie hoofdstuk 4). Een bepaling van lysozymgehalte in plasma op dag 2 en dag 16 van de hepatitis werd eveneens verricht, zoals beschreven in hoofdstuk 4. Bij 5 patiënten werd wegens tekenen van encefalopathie 6 gram neomycine per dag per os of via een maagslang toegediend.

Resultaten

Endotoxinemie en acute hepatitis

Bij 8 van de 22 (36,4%) patiënten met acute hepatitis waren endotoxinen aantoonbaar in één of meer van de drie bloedmonsters die in de eerste week van opname afgenomen werden. Bij 4 van deze 8 patiënten waren endotoxinen in het eerste monster aanwezig. Bij een positieve uitslag werd behalve de standaardverdunding van 1 op 10 een verdere verdunding verricht om een semi-kwantitatieve uitslag te verkrijgen. Bij uitverdunden, 1 op 15, 1 op 20 en/of 1 op 25, waren alle bepalingen negatief, zodat in het vervolg alleen gesproken wordt over positief en negatief op grond van de standaardverdunding. Van de 8 patiënten met endotoxinemie overleden er 2 en van de 14 patiënten zonder endotoxinemie bleven allen in leven ($p = 0,24$). Bij alle patiënten met endotoxinemie die niet overleden verdween de endotoxinemie (zie fig. 8).

Bij de patiënten met een GPT-piek groter dan 1350 E/l (normaalwaarde kleiner dan 30) was bij 7 van de 12 patiënten sprake van endotoxinemie in tegenstelling tot slechts bij 1 van de 10 patiënten met een piek GPT kleiner dan 1350 E/l ($p < 0,05$). Bovendien was het aantal positieve limulustesten gedurende de eerste week van opname significant hoger bij patiënten met een piek GPT-spiegel groter dan 1350 E/l dan bij patiënten met een piek kleiner dan 1350 E/l (resp. 11 van de 36 en 1 van de 30, $p < 0,01$). Omgekeerd: bij de patiënten met endotoxinemie was de GPT-spiegel groter dan 1350 E/l bij 7 van de 8 patiënten, terwijl bij patiënten zonder endotoxinemie de GPT-spiegel bij 5 van de 14 groter was dan 1350 E/l ($p < 0,05$). De ene patiënte met endotoxinemie en een GPT-spiegel kleiner dan 1350 E/l had een zeer ernstige levernecrose (zij is daaraan overleden) en haar spiegel van 616 E/l, de laagste van de gehele endotoxinemie-groep van 22 patiënten, weerspiegelt niet de ernst doch waarschijnlijk meer de late fase van de hepatitis.

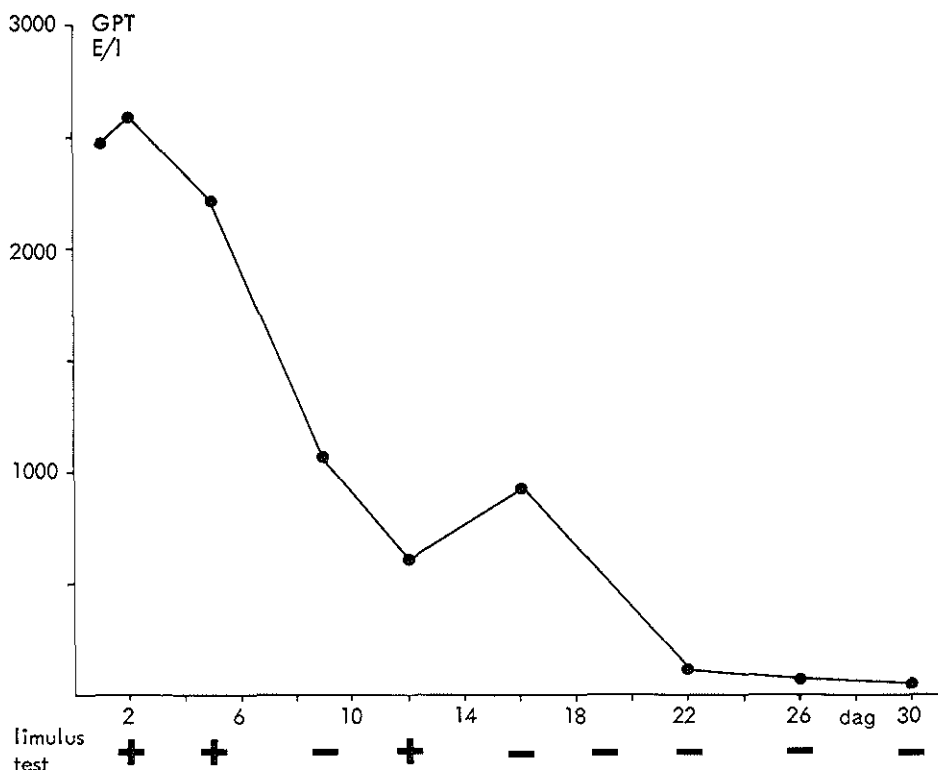


Fig. 8. Voorbeeld van het verloop van de limulustest en de GPT-spiegel bij een patiënt met acute hepatitis.

Bij vergelijken van de groep patiënten met en zonder endotoxinemie in de eerste week van opname verkrijgen wij de bevindingen vermeld in tabel 3. Het serumcreatininegehalte (\bar{x}) was significant hoger bij de endotoxinemie-groep in de beginperiode van de opname vergeleken met de waarde bij herstel ($p < 0.02$). Het verschil met de negatieve groep was heel duidelijk ($p < 0.002$) bij de beginfase van opname. Bij herstel was het verschil in de groep met en zonder endotoxinemie nog niet significant, doch deze significantie werd veroorzaakt door één patiënt met een bekende gestoorde nierfunctie (serumcreatinine circa $225 \mu\text{mol/l}$ en status na eenzijdige nefrectomie). Overigens dient opgemerkt te worden dat de nierfunctiewaarden van de endotoxinemie-groep afkomstig zijn van 7 patiënten, daar er bij 1 patiënt hemodialyse als onderdeel van de behandeling van haar leverlijden gegeven werd en er dus geen reële piek serumcreatininewaarde aanwezig is.

Het trombocytenaantal bij de patiënten met endotoxinemie is significant lager dan bij de patiënten zonder endotoxinemie. Bij 5 van de 8 patiënten met endotoxinemie was er sprake van een trombopenie (gedefinieerd als trombocytenaantal minder dan $120 \times 10^9/l$). In de andere patiëntengroep kwam geen trombopenie voor ($p < 0.005$). Bij de endotoxinemie-groep was zowel de normotest als de fibrinogeenbepaling significant lager dan bij de groep zonder endotoxinemie. Bij 3 van de 8

Tabel 3: Enkele laboratoriumuitslagen van acute hepatitispatiënten met of zonder endotoxinemie in de eerste week van opname ($\bar{x} \pm SD$).

	endotoxinen + (n = 8)	endotoxinen— (n = 14)	Mann-Whitney U-toets
laagste trombocyten- aantal $10^9/l$	140 ± 116	226 ± 39	$p = 0,05$
piek creatinine $\mu\text{mol/l}$	292 ± 323	83 ± 16	$p < 0,002$
creatinine bij herstel	106 ± 48	76 ± 12	$p < 0,05$
piek GPT E/l	2502 ± 1942	1417 ± 830	$p = 0,10$
piek bilirubine $\mu\text{mol/l}$	335 ± 189	137 ± 93	$p < 0,02$
normotest %	$31,4 \pm 26,3$	$73,4 \pm 22,5$	$p = 0,002$
fibrinogeen g/l	$1,25 \pm 0,81$	$2,41 \pm 0,58$	$p = 0,014$
lysozym $\mu\text{g/ml}$	$2,36 \pm 1,46$	$5,36 \pm 3,98$	$p < 0,05$

endotoxinemie-patiënten was een verhoogde waarde van fibrinogeenafbraak-producten aanwezig. De 2 patiënten met endotoxinemie die overleden, hadden elk een normotest kleiner dan 10%.

Van de 8 patiënten met endotoxinemie was er in de week van opname bij 5 van hen sprake van een temperatuur, gedurende 1 of meerdere dagen, variërend tussen 37,5 en 38,0 ° C, echter bij de 14 patiënten zonder endotoxinemie was de temperatuur steeds lager dan 37,5° C ($p < 0,005$). Bij 3 patiënten met endotoxinemie werden frequent bloedkweken afgenomen en van de totaal 26 kweken was de uitslag van één kweek positief (*Klebsiella*), zij het in slechts 1 van de 2 flesjes. Het leukocytenaantal verschilde niet bij de patiënten met of zonder endotoxinemie ($7,8 \pm 5,0$ resp. $6,6 \pm 1,3 \times 10^9/l$, $p > 0,10$).

Bij 5 van de 8 endotoxinemie-patiënten waren er tekenen van encefalopathie: bij 3 was er sufheid, en coma ontstond bij de twee patiënten die later overleden zijn. Bij geen van de patiënten zonder endotoxinemie was er sprake van encefalopathie. Drie tot zes maanden na ontslag waren de transaminase-waarden slechts bij 1 van de 20 patiënten sterk verhoogd (groter dan 5 keer de bovengrens). Bij de overigen waren ze normaal of op een niveau niet hoger dan 2 keer de bovengrens. Endotoxinemie tijdens opname had geen invloed op de transaminase-waarden na ontslag.

RES-functie en acute hepatitis

De T/2 van toegediend technetium-colloïd als maat voor RES-functie, die bij 8 van de 22 patiënten bepaald werd (zie fig. 9), bleek significant lager te zijn bij acute

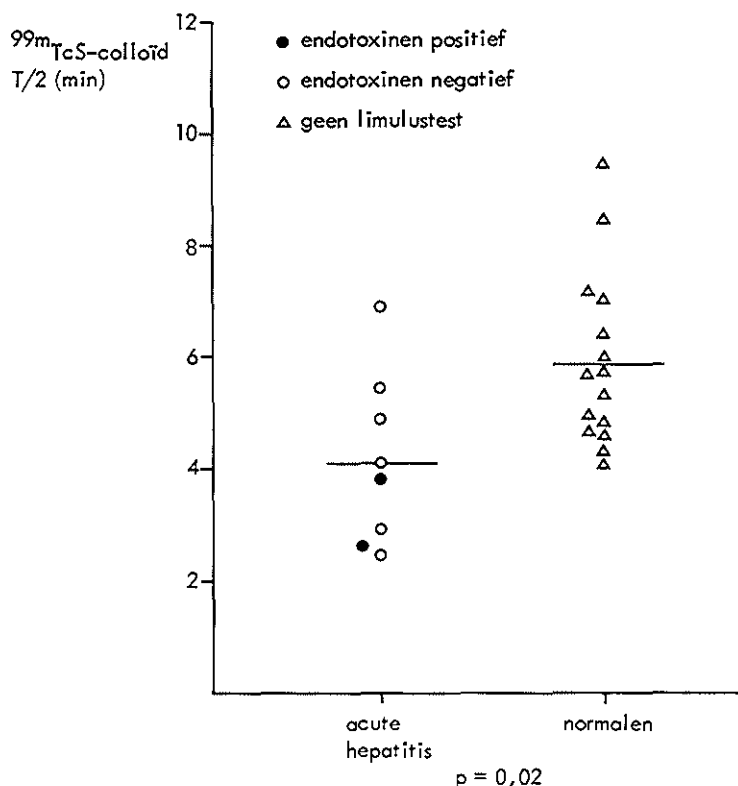


Fig. 9. RES-functie gemeten met behulp van technetium-colloïd bij normalen en patiënten met hepatitis.

hepatitis in vergelijking met normalen ($p = 0,02$). Deze versnelde klaring van colloïd wijst op een actiever RES bij deze patiëntengroep. Opvallend is dat de 2 patiënten met endotoxinemie beiden onder het gemiddelde liggen van de T/2 van de acute hepatitis-groep. De bepaling van plasmalysozym bij de 22 patiënten met acute hepatitis toonde een significant lagere waarde dan bij normalen. Tijdens herstel treedt er bij de meesten een stijging op in het plasmalysozymgehalte, doch twee weken na opname is er nog geen normalisering bereikt (zie fig. 10). Het plasmalysozymgehalte bij patiënten met endotoxinemie was significant hoger dan bij patiënten zonder endotoxinemie ($p < 0,05$).

Discussie

In 1974 deelden Wardle en Wilkinson e.a. mee dat acute leverinsufficiëntie bij de mens gepaard gaat met de aanwezigheid van endotoxinen in plasma. Uit de publicatie van Wilkinson e.a. (1974) blijkt dat alle 14 patiënten waarbij endotoxinen aangetoond werden tijdens opname overleden, in tegenstelling tot slechts 2 van de 8 patiënten zonder endotoxinemie. Er was een significant verband tussen endotoxinemie en het verslechteren van de nierfunctie en ook met de aanwezigheid

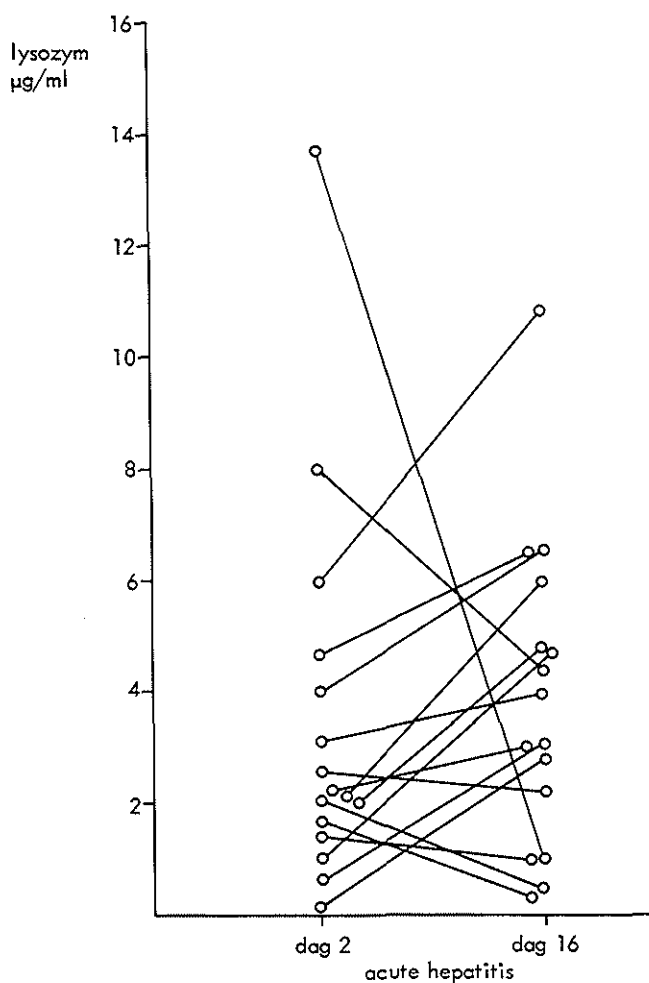


Fig. 10. Het plasmaalysozymgehalte gemeten op dag 2 en 16 van opname bij patiënten met acute hepatitis. (De normaalwaarde voor lysozym in plasma is $6,05 \pm 1,63 \mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 20$).

van intravasale stolling. Bij geen van de 14 patiënten met endotoxinemie was er sprake van een positieve bloedkweek met gramnegatieve bacteriën. Liehr en Grün (1977) stelden bij 3 van de 3 patiënten met acute leverinsufficiëntie een endotoxinemie vast.

Bij de in dit hoofdstuk beschreven patiënten met acute hepatitis hadden 8 van de 22 patiënten (36%) een endotoxinemie. Twee van deze 8 patiënten overleden; de overigen herstelden waarbij de endotoxinemie verdween. De 2 patiënten die overleden, waren tijdens opname comateus. Het is daarom waarschijnlijk juist om bij deze twee patiënten te spreken van een acute hepatitis gecompliceerd door acute leverinsufficiëntie. Het feit dat twee van de 22 patiënten overleden mag niet tot de

conclusie leiden dat de mortaliteit van acute hepatitis de 10% benadert. De hier beschreven acute hepatitisgroep hoeft immers niet representatief te zijn voor acute hepatitis in het algemeen. Liehr en Grün (1977) vonden bij 16 van een groep van 38 patiënten met virale hepatitis, waarvan 3 met acute leverinsufficiëntie, een endotoxinemie. Het door Liehr en Grün (1977) vastgestelde percentage endotoxinemie van 42% komt overeen met de door ons gevonden 36%.

Endotoxinemie bij acute hepatitis blijkt, zoals hierboven beschreven, op te treden bij de meer ernstige vormen van hepatitis en gaat gepaard met een significant slechtere stollingsstatus. Het aantal trombocyten, de normotest en het fibrinogeengehalte is bij patiënten met endotoxinemie significant lager. Bij 3 van de 8 patiënten met endotoxinemie werden aanwijzingen voor intravasale stolling gevonden. Intravasale stolling bij leverlijden is een complex gebeuren. De lever heeft behalve een functie bij de synthese van stollingsfactoren ook een functie bij de afbraak van geactiveerde stollingsfactoren en de synthese van stollingsremmers (Poller 1977). Van endotoxinen is bekend dat zij aanleiding kunnen geven tot intravasale stolling en beschadiging van trombocyten met als gevolg trombopenie (Morrison en Cochrane 1974, Elin en Wolff 1976, Hawiger e.a. 1977).

Door Das e.a. (1973) werd gepubliceerd dat in een experimentele situatie endotoxinen langer in bloed aantoonbaar blijven bij trombopenie. Bij die experimenten echter was de trombopenie tevoren opgewekt door herhaalde injecties met busulfan. De werking van het RES wordt door cytostatica geremd (Rose e.a. 1972, Dankert e.a. 1979). Een endotoxinemie, die langer blijft bestaan bij de aanwezigheid van een trombopenie door busulfan-injecties, is ook met een gestoorde RES-werking te verklaren.

Opmerkelijk is voorts dat de 2 van de 8 patiënten met endotoxinemie en een normotest kleiner dan 10% beiden overleden aan de gevolgen van acute hepatitis. Deze waarneming onderstreept het prognostische belang van de stollingsfactoren-bepaling (Gazzard e.a. 1976, Poller 1977).

Bij de patiënten met acute hepatitis met endotoxinemie was de nierfunctie, te oordelen naar het serumcreatininegehalte, significant slechter dan bij de patiënten zonder endotoxinemie. Van de 6 patiënten met endotoxinemie die overleefden, bleek bij herstel van de hepatitis dat de stoornis in de nierfunctie volledig reversibel was. Nierfunctiestoornissen bij acute leverinsufficiëntie en levercirrose zijn daarentegen meestal niet reversibel (Wilkinson e.a. 1975, Wilkinson e.a. 1976, Clemente e.a. 1977). Het optreden van nierfunctiestoornissen bij acute hepatitis is niet ongevoel. Wilkinson e.a. beschreven in 1978(a) een groep van 12 patiënten met acute hepatitis met als enige complicatie een gestoorde nierfunctie. Bij 10 van de 12 patiënten bleek het noodzakelijk de nierinsufficiëntie met dialyse te behandelen.

De verminderde nierfunctie bij endotoxinemie is op drie manieren te verklaren. Ten eerste kunnen endotoxinen aanleiding geven tot intravasale stolling. Deze stollingsstoornis werd echter maar bij 3 van de 8 patiënten aangetoond. Een ander mechanisme voor nierfunctiebeschadiging door endotoxinen is hypotensie, doch dit werd bij geen van de patiënten tijdens de opnameperiode waargenomen. Tenslotte kunnen

endotoxinen ook aanleiding geven tot verminderde doorbloeding van de nierschors door arteriële vasoconstrictie (Cavanagh e.a. 1970, Epstein e.a. 1970, Wilkinson e.a. 1975). Of deze laatste mogelijkheid de oorzaak is van de verminderde nierfunctie bij endotoxinemie bij onze patiënten is onbekend.

Het serumbilirubinegehalte was bij de endotoxinemie-patiënten significant hoger dan bij de patiënten zonder endotoxinemie. Hoewel niet uitgesloten is dat de gestoorde nierfunctie bij deze patiënten hieraan een bijdrage geleverd heeft, weerspiegelt de mate van de bilirubinemie in de eerste plaats de ernst van de hepatitis.

Over de betekenis van de RES-functie meting en de lysozymbepaling bij acute hepatitis wordt nader ingegaan in hoofdstuk 6, waar zij besproken worden in combinatie met dezelfde bepalingen, verricht bij een groep patiënten met levercirrose.

Conclusie

1. Bij 8 patiënten van een groep van 22 met acute hepatitis werd endotoxinemie vastgesteld (36%).
2. Bij patiënten met endotoxinemie is er in vergelijking met patiënten zonder endotoxinemie een significant lager trombocytenaantal, fibrinogeengehalte en normotestpercentage, en een significant hogere spiegel van GPT en bilirubine.
3. Bij herstel van de hepatitis verdwijnt de endotoxinemie en normaliseren de laboratoriumuitslagen, zodat het verschil tussen de twee groepen hepatitispatiënten verdwijnt.
4. Bij endotoxinemie is de nierfunctie, te oordelen aan het serumcreatininegehalte, significant slechter; bij herstel van de hepatitis is de nierfunctiestoornis reversibel.
5. Bij de patiënten met acute hepatitis was er bij endotoxinemie sporadisch een positieve bloedkweek voor gramnegatieve bacteriën.
6. Van de 8 patiënten met endotoxinemie zijn er 2 overleden en van de 14 patiënten zonder endotoxinemie overleefde ieder.

6

RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK BIJ PATIENTEN MET LEVERCIRROSE EN EEN MESOCAVALE SHUNT

Inleiding

Portale hypertensie kan het gevolg zijn van een groot aantal oorzaken. Meestal berust zij op cirrose van de lever (Sherlock 1978, Terpstra 1979). Eén van de belangrijkste risico's van portale hypertensie is het optreden van bloedingen uit slokdarm-varices. De chirurgische behandeling van oesofagusvarices omvat decompressie van het portale systeem d.m.v. een shunt-operatie. Het aanleggen van een mesocavale shunt (zie fig. 11) bij een varicesbloeding zou gepaard gaan met een betrekkelijk lage frequentie van problemen zoals encefalopathie, nierfunctiestoornissen en mortaliteit (Cameron e.a. 1979, Dowling 1979).

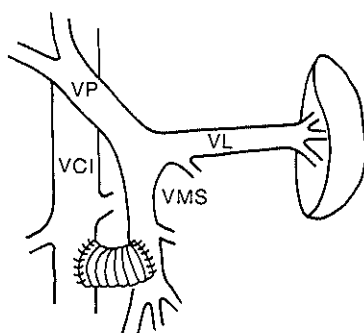


Fig. 11. Bij de mesocavale shunt-operatie wordt de vena mesenterica superior (VMS) d.m.v. een prothese verbonden met de vena cava inferior (VCI).
VP = vena portae, VL = vena lienalis.

Als gevolg van het aanleggen van een mesocavale shunt kunnen echter uit de darm geabsorbeerde stoffen gemakkelijk in de grote circulatie komen zonder eerst door de lever gemetaboliseerd te zijn. Absorptie van endotoxinen uit de darm vindt plaats (zie hoofdstuk 8). De aanwezigheid van een mesocavale shunt zou dus aanleiding kunnen geven tot endotoxinemie met alle mogelijke gevolgen daarvan. Aangezien hierover geen informatie bestaat werd een na-onderzoek verricht bij patiënten die een dergelijke operatie hadden ondergaan.

Daar bij ratten na het aanleggen van een porto-systemische shunt een aanzienlijke stijging in het serumgammaglobulinegehalte ontstaat, met o.a. antilichamen tegen endotoxinen (Keraan e.a. 1974), werd bij onze patiënten tevens het gehalte aan gammaglobuline bepaald en vergeleken met de pre- en post-operatieve waarden. Een mesocavale shunt kan dichtgaan. Voor een juiste beoordeling van de endotoxinemie-frequentie en het verloop van het gammaglobulinegehalte bij patiënten met een dergelijke shunt, is het belangrijk te weten of de shunt na de operatie open gebleven is. Bij de patiënten werd hiernaar dan ook onderzoek verricht.

Patiënten en methoden

Van alle patiënten die een mesocavale shunt-operatie hadden ondergaan in de periode 1-4-1974 tot 31-12-1978, werden de pre- en post-operatieve gegevens bestudeerd. Van deze 32 patiënten (18 mannen en 14 vrouwen) was de aanleiding tot opereren één of meerdere bloedingen uit oesofagusvarices, echter bij één van hen was het recidiverend bloeden uit het caput medusae de reden tot operatie. De leeftijd van de patiënten varieerde van 21 tot 73 jaar (gemiddeld 52,6). De oorzaak van de portale hypertensie was steeds cirrose van de lever. Bij 16 patiënten werd deze veroorzaakt door alcoholgebruik. De overige oorzaken waren chronische actieve hepatitis (4), primaire biliaire cirrose (2), secundaire biliaire cirrose (1) en bij 9 onbekend. Van de 32 patiënten waren er op 31-12-1978 reeds 10 overleden, zodat er 22 overbleven voor een uitgebreider na-onderzoek dat plaats vond tussen 1-4 en 1-7-1979. Hierbij werd in de anamnese o.a. gevraagd naar alcoholgebruik en symptomen wijzend op encefalopathie zoals o.a. verstoring van het dag/nacht ritme, en vergeetachtigheid. Bij het lichamelijk onderzoek werd speciaal de aandacht gericht op flapping tremor, apathie en/of foetor hepaticus, lever- en miltgrootte en aan- of afwezigheid van ascites.

Een cijferverbindingstest ofwel een Reitan trailtest werd verricht (Conn 1977) als medebeoordeling van encefalopathie. Er werden twee typen trailtesten gedaan nl. A en B, waarbij B moeilijker is dan A. Hierna werd bloed afgenomen voor endotoxinenbepaling en voorts voor de bepaling van hemoglobulinegehalte, trombocyten- en leukocytenaantal, creatinine, leverfuncties (bilirubine, GOT, GPT, alkalische fosfatase en gamma-GT), totaal eiwit, eiwitspectrum en normotest. Deze bepalingen geschieden, uitgezonderd de endotoxinenbepaling, volgens routine technieken op het Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium of het Hemostase Laboratorium van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam-Dijkzigt. Bij deze patiëntengroep werd tevens het veneuze plasma-ammoniakgehalte en de immuunglobulinen (immunonefelometrisch), bepaald door respectievelijk het Laboratorium Inwendige Geneeskunde II van het AZR-D en het Centraal Laboratorium van de Bloedtransfusie Dienst te Amsterdam. Tevens werd een serum-totaal galzurenbepaling verricht door middel van een radio-immuno-assay (Van den Berg e.a. 1976).

Evenals bij de patiënten met acute hepatitis werd bij 10 patiënten met een mesocavale

shunt een RES-functie meting verricht zoals beschreven in hoofdstuk 4. Bij deze patiënten werd ook het plasmalysozymgehalte bepaald.

Bij alle patiënten werd onderzocht of er varices in de slokdarm of in de fundus van de maag aanwezig waren. Daarbij werd d.m.v. oesofagus-foto's en doorlichting na het slikken van barium bij de liggende patiënt die tevens zijn buikspieren aanspant, gekeken of er pathologie in de oesofagus of maag aanwezig was. Bij een enkele patiënt werd tevens endoscopie verricht.

Resultaten

Het na-onderzoek

Van de 22 beschikbare patiënten met een mesocavale shunt werd door 21 deelgenomen aan het na-onderzoek. Van deze 21 patiënten (12 mannen en 9 vrouwen) was de gemiddelde leeftijd 54,4 jaar en vond de operatie 6 maanden tot 5 jaar tevoren plaats.

Endotoxinenbepaling en meting van RES-functie

Bij 2 van de 21 patiënten waren endotoxinen in het bloed aantoonbaar (9,5%). Van de 21 patiënten gebruikten er 4 neomycine oraal (in een lage dosering: 0,5 tot 2 gram per dag). Bij 3 anderen was er een anamnese van recent alcoholgebruik. Bij geen van beide patiënten met endotoxinemie was er sprake van neomycine- en/of alcoholgebruik.

Bij 10 van de 21 patiënten werd de verdwijning van technetium-colloïd gemeten. Daarbij bleek (zie fig. 12) dat de T/2 bij deze patiënten ($8,34 \pm 3,57$ min) significant langer was dan bij patiënten met acute hepatitis ($4,16 \pm 1,53$ min, $p < 0,01$) en bij normale proefpersonen ($5,92 \pm 1,55$ min, $p < 0,05$). Desondanks was de frequentie van endotoxinemie (2 van de 21) niet significant hoger dan die bij acute hepatitis (nl. 4 van de 22). De hier genoemde frequenties werden gevonden in het eerste bloedmonster dat voor de bepaling van endotoxinen werd afgenomen. Bij de 2 patiënten met endotoxinemie uit de groep cirrosepatiënten met mesocavale shunt, bleek de waarde van de T/2 beneden het gemiddelde van de gehele groep te liggen.

Het lysozymgehalte in plasma was bij de patiënten met een mesocavale shunt niet significant verschillend van de waarden gevonden bij gezonde proefpersonen, doch was wel significant hoger dan bij patiënten met een acute hepatitis ($p < 0,001$, t-toets van Student, zie fig. 13). Werden de uitkomsten van deze twee patiëntengroepen te zamen genomen, dan bleek er een significante correlatie te bestaan tussen de waarde van de T/2 als maat voor RES-functie en de uitslag van de lysozymbepaling ($r = +0,66$, $p = 0,005$, zie fig. 14).

Het onderzoek naar het bestaan van varices

Om na te gaan of de aangelegde shunt opengebleven was, werd gekozen voor

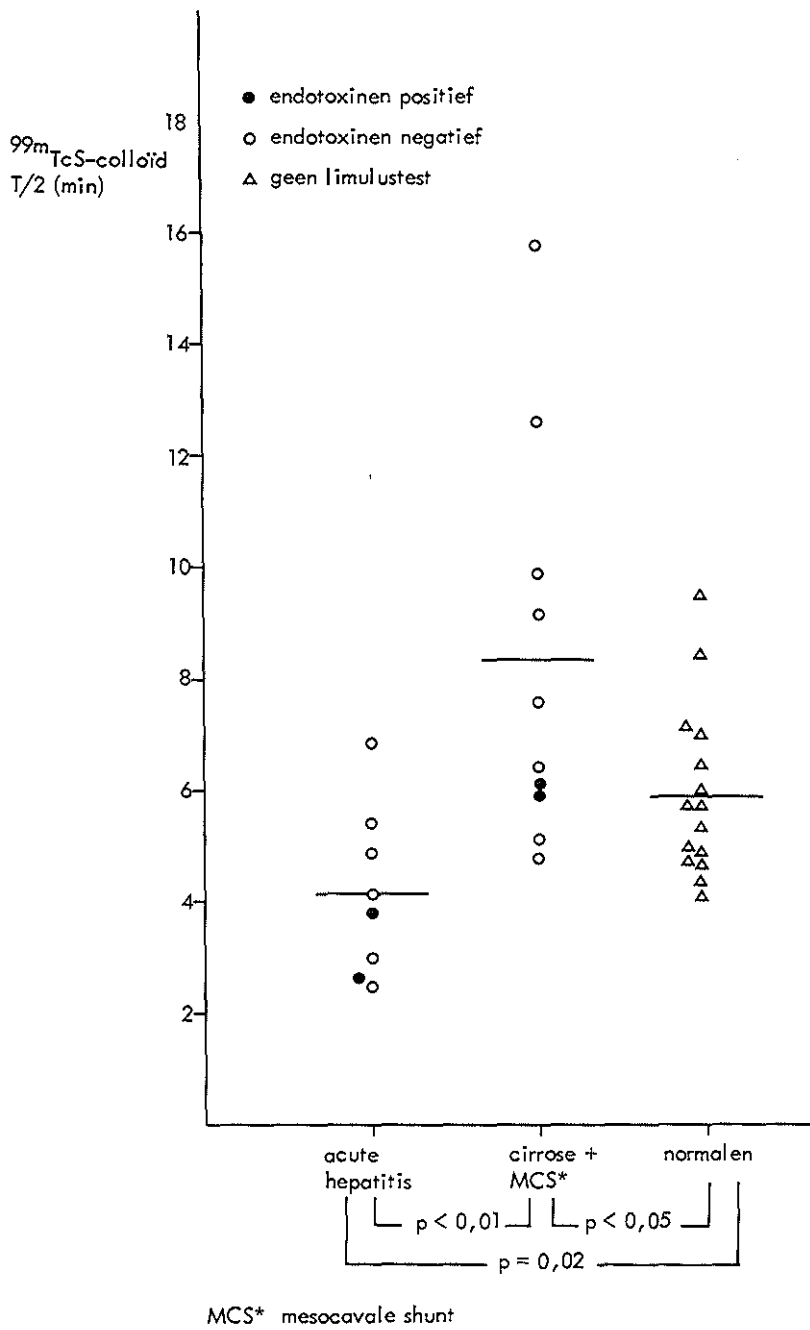


Fig. 12. RES-functie bij patiënten met levercirrose en een mesocavale shunt, bij patiënten met acute hepatitis, en bij normale proefpersonen.

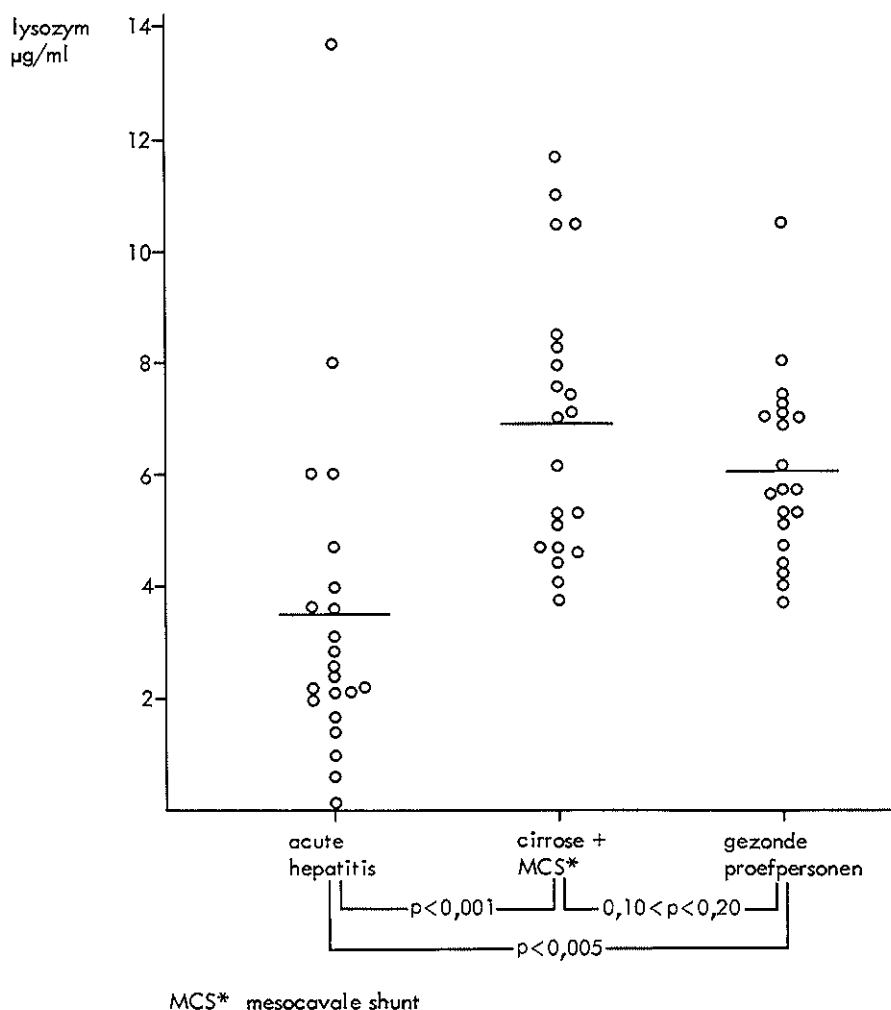


Fig. 13. Het plasmalysozymgehalte bij patiënten met levercirrose en een mesocavale shunt, bij patiënten met acute hepatitis en bij gezonde proefpersonen.

röntgenonderzoek van de slokdarm en de maagfundus. Daarbij werd bekeken of er nog varices aanwezig waren. Het röntgenonderzoek bij de 21 patiënten toonde bij 4 patiënten oesofagusvarices, bij 13 geen varices en bij 3 patiënten dubieuze varices. Bij de resterende patiënt (met endotoxinemie), die in de periode van het na-onderzoek overleed, werd bij obductie aangetoond dat de shunt open was. Van de groep met 3 patiënten met dubieuze varices bij röntgenonderzoek werd bij 2 tevens oesofagogastropie verricht, en daarbij werden geen varices gezien. Er waren dus onder de groep van 21 patiënten 4 (= 19%) patiënten met duidelijke en één patiënt met dubieuze varices. De twee patiënten met endotoxinemie hadden geen aanwijzingen voor varices, zodat aangenomen kan worden dat de mesocavale shunt open was.

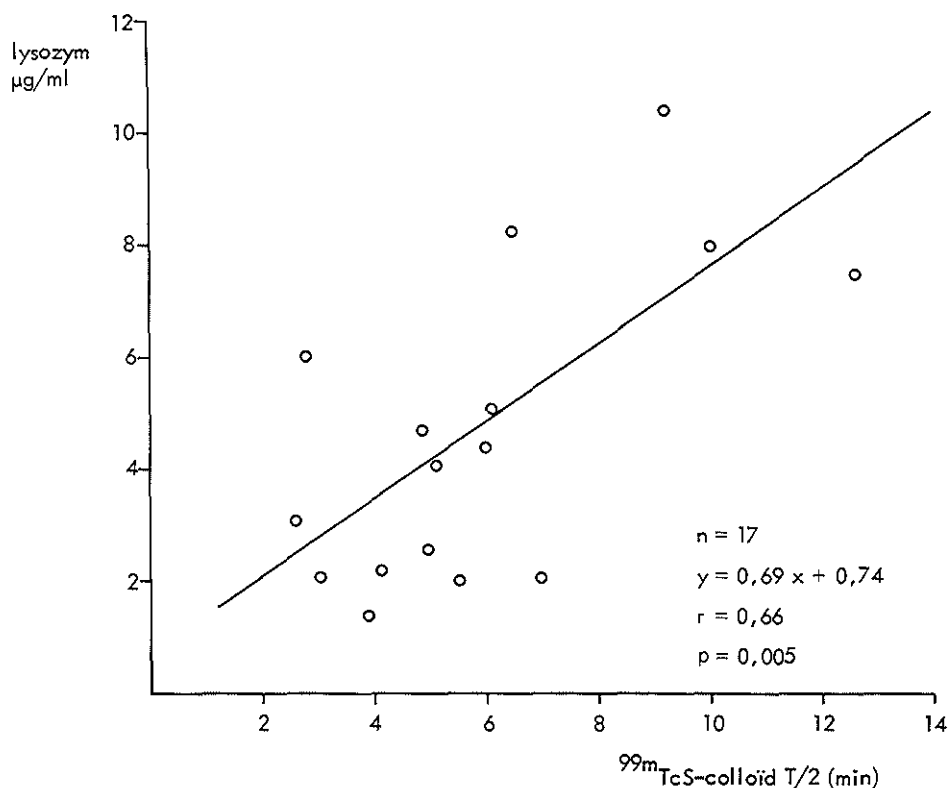


Fig. 14. Correlatie tussen lysozymgehalte en halfwaarde-tijd (T/2) van technetium-colloïd als maat voor RES-functie bij patiënten met acute hepatitis en levercirrose.

Het gehalte aan totaal eiwit, albumine en gammaglobuline in serum

Het onderzoek naar de gehalten aan totaal eiwit, albumine en gammaglobuline in serum bestond uit twee delen. Ten eerste werd bij de 21 beschikbare patiënten bij het na-onderzoek het bloed onderzocht op de gehalten van de genoemde eiwitten. Ten tweede werd bij de in totaal 32 geopereerde patiënten retrospectief nagegaan, aan de hand van de gegevens vermeld in de statussen, wat het beloop was van de eiwitgehalten post-operatief in vergelijking met pre-operatief.

A. Na-onderzoek. Bij 14 van de 21 patiënten (66,7%) was het gammaglobulinegehalte van het serum verhoogd d.w.z. dat het gehalte groter was dan 16 g/l. Bij 8 van de 21 patiënten (38,1%) was het albuminegehalte van het serum verlaagd, d.w.z. dat het gehalte lager was dan 36 g/l. Bij 7 patiënten was zowel het gammaglobuline- als het albuminegehalte afwijkend. Gemiddeld bedroeg het gammaglobulinegehalte van de gehele groep 20,4 g/l (spreiding 9,1 tot 40 g/l) en het albuminegehalte 39,0 g/l (spreiding 26,8 tot 53,5 g/l). Er bestond een negatieve doch significante correlatie

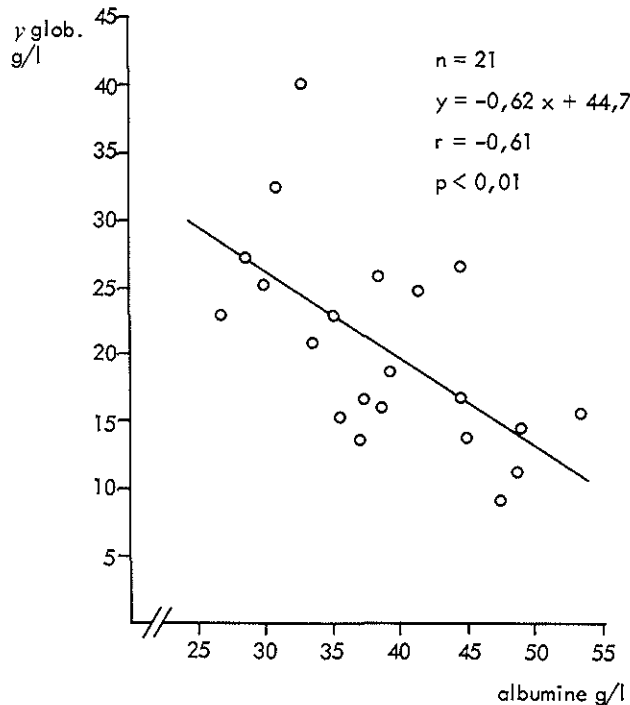


Fig. 15. Correlatie tussen het albumine- en gammaglobulinegehalte in serum van patiënten met levercirrose en een mesocavale shunt.

tussen het gehalte aan gammaglobuline en albumine ($r = -0,61$, $p < 0,01$, zie fig. 15). De kwantitatieve bepaling van serumimmuunglobulinen toonde dat het IgG-gehalte bij 12, het IgA-gehalte bij 14 en het IgM-gehalte bij 4 van de 21 patiënten verhoogd was (zie fig. 16). Slechts 3 van de 21 patiënten hadden normale gehalten van zowel IgG, IgA als IgM. Bij 1 patiënt was zowel het IgA- als het IgM-gehalte verlaagd. Bij deze patiënt was in het verleden een splenectomie verricht. Bij 2 andere patiënten die eveneens splenectomie hadden ondergaan, waren de immuunglobulinen niet verlaagd. Er werd 4 maal een verhoogd IgM-gehalte gemeten. Bij één van deze 4 patiënten was er sprake van een primaire biliare cirrose. Deze diagnose berustte op de aanwezigheid van antilichamen in het serum tegen mitochondriën en op afwijkingen aanwezig in een leverbiopsie.

B. Retrospectief onderzoek. Van de 32 geopereerde patiënten werd aan de hand van gegevens uit de statussen het pre- en post-operatieve beloop van het gehalte van een aantal eiwitten in het serum met elkaar vergeleken. Bij 23 patiënten waren de gegevens van het pre- en post-operatieve eiwitspectrum bekend. De gegevens van de eiwitgehalten staan vermeld in tabel 4. Als pre-operatieve waarde is genomen het eerste eiwitspectrum bij opname. Indien er één of meerdere eiwitspectra bekend waren van het voorgaande halfjaar, dan werd per patiënt het gemiddelde van de beschikbare waarden berekend. De post-operatieve waarde is de gemiddelde waarde

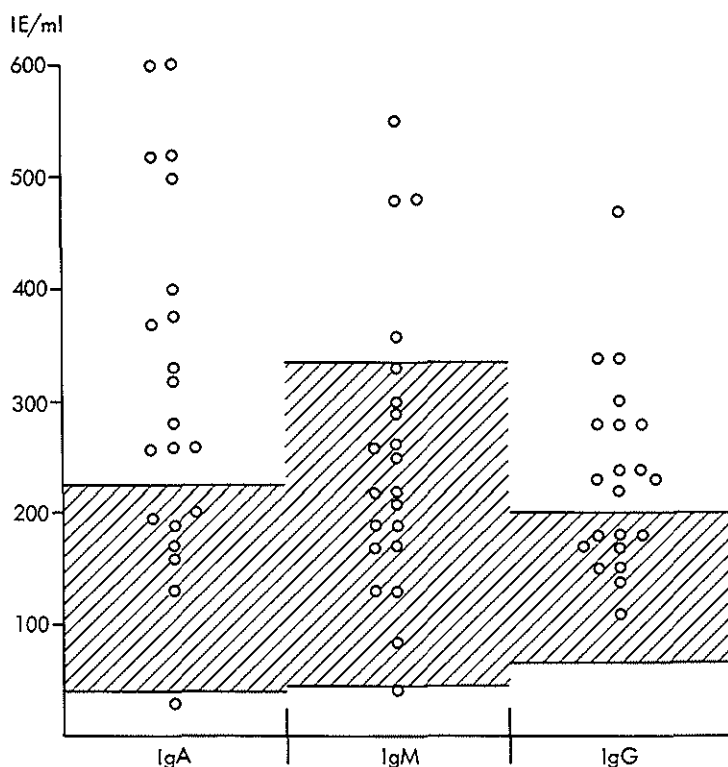


Fig. 16. Immuunglobulinen bij 21 patiënten met levercirrose en een mesocavale shunt ($\frac{1}{2}$ - 5 jaar na de operatie). De normaalwaarden zijn gearceerd weergegeven.

van de bepalingen uit de periode 1 week tot een $\frac{1}{2}$ jaar na de operatie. De waarde van 1, 2, etc. jaar na operatie zijn de gemiddelde waarden van de perioden een $\frac{1}{2}$ jaar vóór en na dat tijdstip. De gemiddelde waarde per patiënt diende telkens als uitgangswaarde voor de berekening van de gemiddelde waarde voor de groep in die bepaalde tijd. Opvallend is de sterke stijging van het gammaglobulinegehalte in de post-operatieve periode ($p < 0,0001$, zie tabel 4). De stijging is 4 jaar na de operatie nog significant ($p < 0,05$). De post-operatieve stijging in gammaglobulinegehalte treedt op bij pre-operatief normaal of verhoogd gammaglobuline (zie fig. 17 en 18). Het albuminegehalte blijft steeds op hetzelfde niveau. Het totaal eiwitgehalte is post-operatief steeds significant hoger dan pre-operatief.

De waarden van totaal eiwit, albumine en gammaglobuline bij de 20 gezonde personen van dezelfde leeftijd als de patiënten, verschilden alle significant van soortgelijke waarden die pre-operatief werden vastgesteld bij cirrose-patiënten. De waarden van totaal eiwit, gammaglobuline en albumine die tijdens het na-onderzoek werden gevonden bij patiënten met aanwijzingen voor varices waren niet significant anders dan van patiënten zonder varices in oesofagus en/of maag ($p >> 0,10$).

Tabel 4: Overzicht van verloop van gehalten in serum van totaal eiwit, albumine en γ globuline en de daaruit te berekenen ratio's bij patiënten met levercirrose en een mesocavale shunt.
 Waarden als gemiddelde \pm SD. Het eronder vermelde cijfer duidt op de p-waarde bij eenzijdige toetsing t.o.v. de pre-operatieve gehalten.

	n	totaal eiwit g/l	albumine g/l	γ globuline g/l	alb./ γ glob.	tot. eiwit/ γ glob.
pre-operatief	23	65,1 \pm 8,2	37,2 \pm 5,5	14,7 \pm 4,4	2,76 \pm 1,05	4,73 \pm 1,26
post-operatief	22	74,3 \pm 5,9 2	37,8 \pm 4,6 7	22,5 \pm 5,2 1	1,78 \pm 0,50 1	3,43 \pm 0,67 1
1 jaar post-operatief	18	72,6 \pm 5,7 3	37,0 \pm 5,9 7	21,9 \pm 5,2 1	1,84 \pm 0,78 1	3,51 \pm 0,92 1
2 jaar post-operatief	13	72,2 \pm 6,5 3	37,0 \pm 6,6 7	21,2 \pm 8,6 3	2,16 \pm 1,35 4	2,16 \pm 1,79 4
3 jaar post-operatief	7	69,5 \pm 4,1 5	37,4 \pm 8,8 7	18,7 \pm 6,8 5	2,46 \pm 1,57 6	4,27 \pm 1,88 6
4 jaar post-operatief	5	72,9 \pm 8,1 4	40,6 \pm 8,9 7	18,1 \pm 2,1 5	2,31 \pm 0,78 6	4,11 \pm 0,89 6
normalen	20	73,8 \pm 4,7 3	46,2 \pm 4,4 1	10,3 \pm 2,4 2	4,80 \pm 1,56 1	7,58 \pm 2,01 1

1 = $p \leq 0,0001$

5 = $p \leq 0,05$

2 = $p \leq 0,0005$

6 = $p \geq 0,10$

3 = $p \leq 0,005$

7 = $p \geq 0,15$

4 = $p \leq 0,025$

De pre-operatieve eiwitgehalten van de groep van 7 patiënten die in de eerste post-operatieve maand overleden waren niet significant verschillend van de groep van 15 patiënten die een maand na de operatie nog in leven waren ($p > 0,35$).

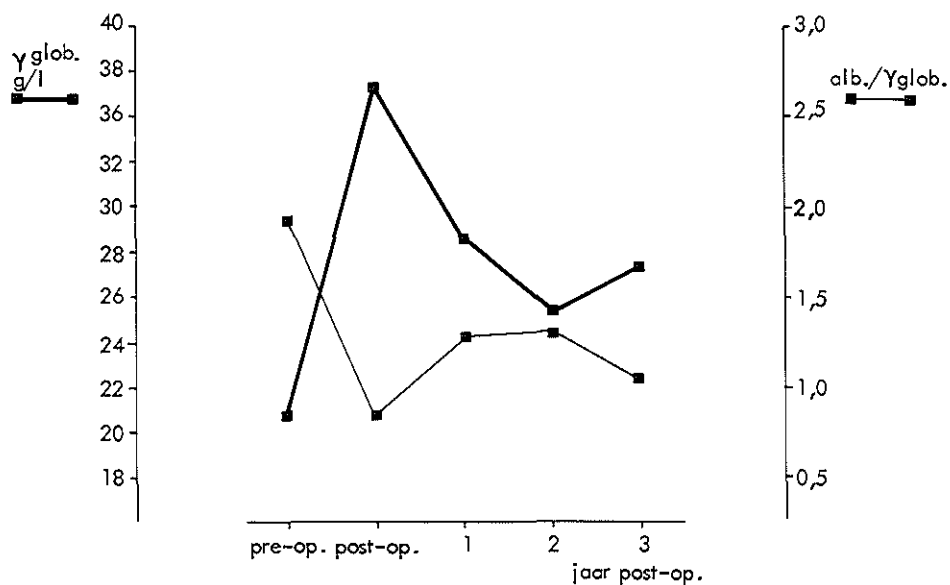
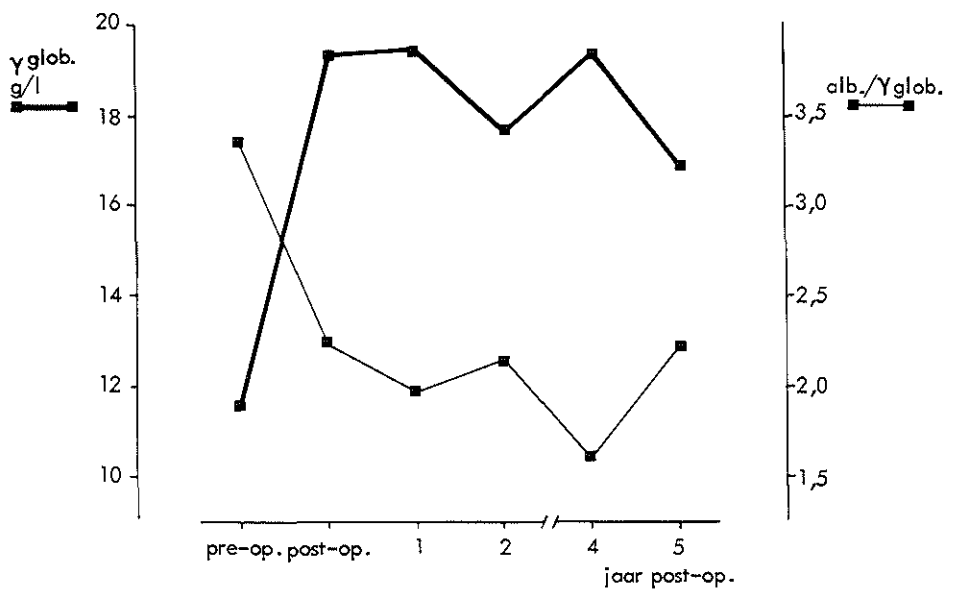


Fig. 17 Stijging in serumgammaglobuline en daling van de ratio albumine en gammaglobuline na een meso- en 18. cavale shunt-operatie bij een patiënt met levercirrose die pre-operatief een normaal gammaglobulinegehalte had (fig.17) en een patiënt die pre-operatief een verhoogd gammaglobulinegehalte had (fig.18).

Enkele andere gegevens verkregen bij het na-onderzoek

Bij 3 van de 21 patiënten uit het na-onderzoek was het ammoniakgehalte lager dan $60 \mu\text{mol/l}$. Het galzurengehalte in serum was bij alle patiënten verhoogd. Er was geen significante correlatie tussen de mate van verhoging van beide bepalingen ($r = +0,24$). Voorts bleek er geen significante correlatie te bestaan tussen het plasma-ammoniakgehalte en de twee trailtesten A en B (respectievelijk $r = -0,04$ en $r = -0,17$), evenmin tussen de galzurenbepaling en de trailtesten ($r = -0,22$). Overigens was er wel een significante correlatie tussen de beide trailtesten onderling ($r = +0,80$, $p < 0,001$).

Bij 4 van de 21 patiënten waren er aanwijzingen voor een lichte mate van encefalopathie. Bij allen was het ammoniak- en galzurengehalte in het bloed verhoogd. Opmerkelijk is dat de 2 patiënten met endotoxinemie allebei kenmerken van encefalopathie vertoonden.

Het overlijden na een mesocavale shunt-operatie

Van de 32 patiënten die een mesocavale shunt-operatie ondergaan hadden, waren er bij afsluiting van het na-onderzoek 11 overleden. In de eerste post-operatieve maand overleden er 7, de andere 4 zijn overleden 2, 12, 40 en 42 maanden na de operatie. Van deze laatste 4 patiënten was de doodsoorzaak respectievelijk onbehandelbare hartritmestoornissen, subarachnoïdale bloeding en bij de overige 2 een leverinsufficiëntie. Van 3 van de 11 overleden patiënten waren buiten het kader van het na-onderzoek bepalingen van endotoxinen verricht. Bij 2 was er sprake van endotoxinemie en beiden zijn overleden tengevolge van leverinsufficiëntie. Bij de andere patiënt was er geen sprake van endotoxinemie en deze is overleden aan een cerebro-vasculair accident (CVA).

Van de 7 patiënten die in de eerste post-operatieve maand overleden zijn (gemiddeld na 13 dagen, spreiding 1 tot 30 dagen) waren bij 5 belangrijke problemen in de bloedstolling. Bij de andere 2 volgde het overlijden bij de één t.g.v. een CVA (op basis van een embolie) en bij de andere door progressieve leverinsufficiëntie. Opvallend is dat bij 6 van de 7 patiënten er een trombopenie aanwezig was, en voorts een gestoorde nierfunctie, die bij allen aanvankelijk niet aanwezig was (serumcreatinine respectievelijk 78 ± 17 en $295 \pm 125 \mu\text{mol/l}$, $p < 0,005$, t-toets van Student). Bij de 7 patiënten die overleden zijn, waren in de post-operatieve fase bloedkweken afgenomen en bij 2 van hen werden gramnegatieve bacteriën gekweekt, bij de ene patiënt bestond er een aspiratiepneumonie, bij de andere was de bron onbekend. Bij de ene patiënt die overleden was aan een CVA, bestond er steeds een normaal trombocytenaantal en een normale nierfunctie.

Bij de 21 patiënten van het na-onderzoek was slechts bij 2 van hen een verhoogd serumcreatinine ontstaan in de directe post-operatieve periode. In tegenstelling tot bij 6 van de 7 die in de eerste post-operatieve maand overleden zijn ($p < 0,001$).

Discussie

Bij een éénmalig bloedonderzoek op endotoxinen bestond er bij 2 van de 21 patiënten met levercirrose en een mesocavale shunt een endotoxinemie. Het ontstaan van endotoxinemie bij leverziekten wordt toegeschreven aan de aanwezigheid van porto-systemische shunting en/of een slechter werkend RES (Bradfield 1974, Nolan 1975, Liehr en Grün 1977). Hoewel er dus bij alle hier omschreven 21 patiënten in het verleden een mesocavale shunt was aangelegd, kon er slechts bij 2 van hen een endotoxinemie aangetoond worden. Daar cirrose van de lever een irreversibele aandoening is, zal het dichtgaan van een mesocavale shunt resulteren in een drukverhoging in het portale systeem en het (hernieuwd) ontstaan van varices in oesofagus. Bij 16 van de 21 patiënten werden geen varices aangetoond, zodat aangenomen moet worden dat de shunt nog functioneert. Bij 5 van de onderzochte cirrosepatiënten waren varices aantoonbaar en bij hen bestaat een kans dat de chirurgisch aangelegde shunt niet meer functioneert. De druk in het portale vaatstelsel na het aanleggen van een mesocavale shunt normaliseert niet geheel (Terpstra e.a. 1980). De resterende drukverhoging zou dus een rol kunnen spelen bij het voortbestaan van de varices, zodat de aanwezigheid van varices niet hoeft te betekenen dat de shunt dichtzit.

In ieder geval valt uit deze gegevens over endotoxinemie na een shuntoperatie niet te concluderen dat shunting gevolgd wordt door een hoge frequentie van endotoxinemie. De frequentie is zelfs niet hoger dan bij acute hepatitis, een aandoening waarbij geen verandering in anatomie in de vorm van een shunt aanwezig is.

In ons onderzoek was de RES-functie bij levercirrose met een mesocavale shunt significant slechter dan bij normalen en acute hepatitis. Ook de aanwezigheid van een slechtere werking van het RES resulteerde niet in een hogere frequentie van endotoxinemie bij levercirrose. De RES-functie was bij acute hepatitis zelfs significant beter dan bij normalen. Cooksley e.a. (1973) publiceerden dat de RES-functie bij acute hepatitis verhoogd is en vonden daarbij geen relatie met leverperfusie. De verhoogde RES-activiteit kan worden verklaard door de bij acute hepatitis optredende toename in aantal Kupffercellen (Cooksley e.a. 1973, Van Furth e.a. 1977) en door een grotere activiteit per cel (Cooksley e.a. 1973). De gestoorde RES-functie bij levercirrose is bekend (DeNardo e.a. 1976, Horisawa e.a. 1976, Huet e.a. 1980). De verminderde klaring door de lever kan berusten op shunting (Horisawa e.a. 1976, Huet e.a. 1980) die zowel intrahepatisch (Groszmann e.a. 1977) als extrahepatisch, b.v. oesophagusvarices, aanwezig is. De activiteit van het RES wordt geremd door het gebruik van alcohol (Ali en Nolan 1967, Liu 1979). De werking van het RES zal theoretisch ook gestoord kunnen zijn door een afname in aantal Kupffercellen (Huet e.a. 1980) of een verminderde bereikbaarheid van de Kupffercellen door de vorming van bindweefsel (Schaffner en Popper 1963).

Afgezien van de oorzaak van de verminderde RES-werking is er geen verschil in de frequentie van endotoxinemie bij levercirrose met een mesocavale shunt en bij acute hepatitis. Opvallend is wel dat zowel bij acute hepatitis als bij cirrose endotoxinemie

voorkomt bij die patiënten in elke groep die een lagere T/2 van iv toegediende technetium-colloïd hebben. Van endotoxinen is bekend dat zij het RES activeren (Elin en Wolff 1976).

Het plasmanysozymgehalte bij cirrosepatiënten en gezonde proefpersonen verschilde niet op significante wijze van elkaar. Bij acute hepatitis was het lysozymgehalte verlaagd (zie hoofdstuk 5) ten opzichte van de waarden die bij gezonde proefpersonen en bij patiënten met levercirrose werden gevonden. Er was een significante positieve correlatie bij de cirrose- en hepatitispatiënten tussen de T/2 als maat voor de RES-functie en het lysozymgehalte in plasma. Dit betekent dat een verhoogde activiteit van het RES gepaard gaat met een laag lysozymgehalte in het plasma. Deze bevinding is tegengesteld aan die van Kokoshis en Di Luzio (1979) die meedeelden dat stimulatie van het RES met glucaan resulteerde in hogere lysozymspiegels. Het lysozymgehalte in plasma is de resultante van de productie (Kokoshis en Di Luzio 1979), en de afbraak van het enzym (Loegering e.a. 1976). Het RES speelt een belangrijke rol bij opname van circulerende enzymen uit bloed (Loegering e.a. 1976, Bouma 1979). Onze bevindingen steunen het belang van het RES bij de verwijdering van lysozym uit het bloed.

Bij experimentele acute hepatitis is de colloïdklaring van bloed door het RES gedurende de eerste twee dagen verlaagd en daarna is de activiteit van het RES gedurende meerdere dagen verhoogd. Na 3 weken is de klaring door het RES weer normaal (Rasenack e.a. 1974, Grün en Liehr 1977). Van de 22 patiënten met acute hepatitis hadden er twee een duidelijk hogere lysozymspiegel dan de overige 20. Deze 2 patiënten hadden beiden een hepatitis die acuut was ontstaan, respectievelijk t.g.v. paracetamol, en ischemie die niet langer dan 12 uur voor opname had bestaan. Naar analogie van de experimentele acute hepatitis is het heel goed mogelijk dat de RES-functie bij deze 2 patiënten nog normaal of slechter dan normaal was. De hoge lysozymspiegel is dan te verklaren met een verminderde RES-functie. Bij de overige patiënten was de acute hepatitis meer geleidelijk ontstaan, b.v. tengevolge van hepatitis B virus.

Bij een aantal patiënten met acute hepatitis was de nierfunctie gestoord, doch dit kan niet de oorzaak zijn van de lage uitslag van de lysozymbepaling. Immers bij een creatinine-klaring van minder dan 25 ml per minuut treedt er een stijging van het gehalte aan lysozym in plasma op in plaats van een daling (Hansen e.a. 1972, Pruzansky en Wilson 1977).

Na het aanleggen van een mesocavale shunt bij levercirrose trad een significante stijging op in het gammaglobulinegehalte. Vier jaar na de ingreep bleken de waarden nog verhoogd te zijn. Prytz e.a. (1974) vonden één tot drie weken na het aanleggen van een portocavale shunt eveneens een significante stijging van het gammaglobulinegehalte. In hun studie echter bedroeg de periode van het na-onderzoek maximaal 2 maanden. Zij konden geen relatie aantonen tussen de mate van stijging van gammaglobuline en het aantal toegediende bloedtransfusies. In een controle-groep van 23 patiënten die een longoperatie ondergaan hadden, werd geen significante stijging van het gammaglobuline waargenomen. Eveneens vermeldde zij geen stijging van het

gammaglobuline na het verwijderen van de galblaas en na een maagresectie. Keraan e.a. (1974) toonden bij ratten aan dat na het aanleggen van een portocavale shunt een significante drievoudige stijging van het gammaglobuline in het serum optrad. Deze stijging ontstond niet als de ratten tevens neomycine per os toegediend kregen. Na het aanleggen van de portocavale shunt trad een stijging op van antistoffen tegen lipopolysacchariden van *E. coli* (Keraan e.a. 1974). Ook Benjamin e.a. (1976) vonden een stijging in immuunglobulinen, en wel IgG, bij de rat na het aanleggen van een portocavale shunt.

Op grond van het bovenstaande is het aannemelijk dat antigenen uit de darmen worden opgenomen, dat deze antigenen een bacteriële bron hebben, en dat ze aanleiding geven tot een langdurige verhoging van immuunglobulinen zowel bij mens als bij dier. De toename in gehalte aan antilichamen na het aanleggen van een portocavale shunt tegen het O-antigeen van bacteriën (Björneboe e.a. 1972, Triger e.a. 1972) en lipopolysacchariden van *E. coli* (Keraan e.a. 1974) maakt het waarschijnlijk dat endotoxinen een rol spelen als bacterieel antigeen. Antilichamen bevorderen de fagocytose van een bijbehorend antigeen. Het is mogelijk dat de sterke verhoging van antilichamen in het bloed na het aanbrengen van een mesocavale shunt een toename in klaring van endotoxinen teweegbrengt. Als deze veronderstelling juist is, zou dit een verklaring kunnen inhouden voor het beperkt aantal gevallen waarbij endotoxinemie werd gevonden bij de patiënten met een mesocavale shunt.

De meting van RES-functie d.m.v. ^{99m}TcS -colloïd is niet afhankelijk van de aanwezigheid van antilichamen (Stiffel e.a. 1970). Op grond van de zojuist genoemde veronderstelling, dat antilichamen de endotoxinenklaring verbeteren, is het dus mogelijk dat de voor ons onderzoek gebruikte methode van RES-functie meting een onjuiste maat is voor endotoxinenklaring.

De stijging in gammaglobuline die optreedt na een mesocavale shunt-operatie is significant. Het is mogelijk dat het gehalte aan gammaglobuline pre-operatief verlaagd was t.g.v. verlies door de bloeding. Echter de ratio van albumine of totaal eiwit en gammaglobuline, die niet door de bloeding verandert, is eveneens significant verlaagd na de operatie. Deze daling is echter 3 tot 4 jaar na de operatie niet meer significant. Dit is behalve door een mogelijk vals-laag gammaglobuline bij opname ook te verklaren door het kleine aantal van de patiënten dat 3 tot 4 jaar na de operatie aanwezig is.

De hypergammaglobulinemie na shunt-operatie berust op een verhoging van alle drie gemeten immuunglobulinenklassen. De sterkste stijging vertonen IgA en IgG. Deze stijging berust op een andere verdeling in de bloedbaan van geabsorbeerde antigenen. Doordat het portale bloed via de shunt en dus zonder klaring door de lever rechtstreeks in de circulatie komt, ontstaat er een toegenomen antilichaam-productie (Thomas e.a. 1973, Keraan e.a. 1974, Benjamin e.a. 1976). Behalve dat door deze aanhoudende antigene prikkel een IgG-verhoging optreedt, kan ook een IgA-verhoging ontstaan. Deze toename in IgA is vooral aanwezig bij alcoholisch leverlijden en wordt toegeschreven aan toename van productie in zowel darmen als beenmerg (Prytz e.a. 1977, Thomas en Jewell 1979a, 1979b). De aanwezigheid van

IgA-neerslagen in de lever kan zelfs een specifiek beeld tonen voor alcoholisch leverlijden (Kater e.a. 1979). Van de 21 patiënten met een mesocavale shunt hadden 3 patiënten bij het na-onderzoek een anamnese van recent alcoholgebruik en zij hadden alle drie een verhoogd IgA-gehalte. De overige 18 patiënten hadden sinds de operatie geen alcohol gebruikt, hoewel de meesten van hen in het verleden wel een door alcohol beschadigde lever hadden verkregen.

Anamnestic is het erg moeilijk exacte informatie over alcoholgebruik te verkrijgen (Orrego e.a. 1979). Cohen en Kaplan (1979) hebben gesteld dat een ratio van GOT en GPT groter dan 2 zeer suggestief zou zijn voor alcoholische leverbeschadiging. In de huidige serie was deze ratio slechts bij 6 van de 21 patiënten groter dan 2. Bij 5 van deze 6 patiënten was het IgA-gehalte verhoogd. De IgA-verhoging, die bij 14 van de totale groep van 21 patiënten aanwezig was, kon dus bij de meerderheid van hen niet door recent alcoholgebruik verklaard worden.

Een verhoogd IgA-gehalte komt eveneens voor bij een niet-alcoholische levercirrose, zij het dan dat de mate van verhoging minder groot is (Prytz e.a. 1973).

Bij levercirrose is er een toegenomen synthese van immuunglobulinen (Berger e.a. 1979, Stobo 1979, Thomas en Jewell 1979a). De preciese oorzaak hiervan is niet goed bekend (Stobo 1979, Thomas en Jewell 1979a). Endotoxinen kunnen aanleiding geven tot verhoogde productie van IgA en IgG (zie hoofdstuk 2). Bij levercirrose worden de endotoxinen als één van de belangrijke oorzaken beschouwd voor de toegenomen productie van immuunglobulinen (Stobo 1979).

Prytz e.a. (1977) hebben aangetoond dat het gehalte aan immuunglobulinen bij levercirrose hoger is naarmate er meer ontstekingsactiviteit in de lever is en de architectuur van de lever sterker verstoord is. Bij onze patiënten werd bij het na-onderzoek geen biopt uit de lever genomen. Bij het bloedonderzoek bleek er bij patiënten met een cirrose en een mesocavale shunt geen verband te bestaan tussen de hoogte van GOT-spiegel en het gammaglobulinegehalte. Wel bleek dat een verhoogd gehalte aan gammaglobuline gepaard ging met een slechtere werking van de lever. Dit uitte zich in een significant lager gehalte in serum van door de lever gemaakte eiwitten, zoals albumine en stollingsfactoren, en voorts in een significant hoger bilirubinegehalte.

Voor de beoordeling van encefalopathie bij levercirrose kan de trailtest de bepaling van het ammoniakgehalte niet vervangen. Er bestaat tussen de beide bepalingen geen significante correlatie. Conn (1977) vond wel een geringe correlatie tussen de trailtest en het ammoniakgehalte. Onze conclusie is gebaseerd op een éénmalige bepaling. Het is mogelijk dat herhaald gebruik van deze bepaling voor de patiënt van waarde kan zijn.

Van de 32 patiënten met een levercirrose die een mesocavale shunt-operatie ondergingen, overleden er 7 in de eerste post-operatieve maand. De mortaliteit in de onmiddellijke post-operatieve periode trad vooral op bij mensen die acuut geopereerd werden en met name bij die patiënten die een beperkte leverreserve hadden (Terpstra e.a. 1980). Een bestudering van het post-operatieve beloop laat zien dat er bij 6 van de 7 patiënten een trombopenie met gestoorde nierfunctie ont-

stond. Bij 2 van deze patiënten bestond een gramnegatieve sepsis. Over de frequentie van endotoxinemie bij deze 7 patiënten in de post-operatieve periode zijn we onvoldoende geïnformeerd. Het regelmatig voorkomen van trombopenie en gestoorde nierfunctie bij deze patiënten zou kunnen berusten op de aanwezigheid van endotoxinen in het bloed.

Conclusie

1. Bij een na-onderzoek bij 21 patiënten met levercirrose en een mesocavale shunt bestond er bij 2 van hen (9,5%) een endotoxinemie.
2. Varices in de oesofagus werden slechts bij 4 van deze 21 patiënten aangetoond.
3. De RES-functie is bij patiënten met cirrose en een mesocavale shunt significant slechter dan bij gezonde proefpersonen of bij patiënten met acute hepatitis.
4. Ondanks de aanwezigheid van een mesocavale shunt en een gestoorde RES-functie is de aangetoonde endotoxinemie-frequentie bij deze groep van patiënten met cirrose laag.
5. Er bestaat een significante positieve correlatie tussen de T/2 van toegediend ^{99m}TcS-colloïd als maat voor RES-functie en het plasmalysozymgehalte bij patiënten met acute hepatitis en bij patiënten met cirrose en een mesocavale shunt.
6. Bij 14 van de 21 (66,7%) patiënten met een levercirrose en een mesocavale shunt bestond er bij het na-onderzoek een verhoogd gammaglobulinegehalte in het serum. Deze verhoging van gammaglobuline berust vooral op de aanwezigheid van een hoog gehalte aan IgG. Slechts 3 van de 21 patiënten hadden normale gehalten van zowel IgG, IgA als IgM.
7. De verhoging van IgA, die bij 14 van de 21 patiënten aanwezig was, kon bij de meesten van hen niet door recent alcoholgebruik verklaard worden.
8. Bij retrospectief onderzoek bleek dat na een mesocavale shunt-operatie een significante stijging in het gammaglobulinegehalte ontstond en dat het albuminegehalte onveranderd bleef. Deze verhoging in het gammaglobuline was gedurende de gehele onderzoeksperiode van maximaal 4 jaar aanwezig.
9. Endotoxinemie bij het na-onderzoek kwam alleen voor bij patiënten met encefalopathie.
10. Bij de patiënten die in de eerste maand na een mesocavale shunt-operatie overleden, bestond er in die periode significant vaker een gestoorde nierfunctie. Er bestond dan tevens een trombopenie en beide zijn theoretisch te verklaren door endotoxinemie.
11. Gezien de stijging in serumgammaglobuline na een shunt-operatie en gezien het feit dat antilichamen de klaring van antigeen kunnen bevorderen, kan men zich afvragen of de lage endotoxinemie-frequentie bij patiënten met een mesocavale shunt niet het gevolg is van de hoge gehalten aan immuunglobulinen in het serum bij deze patiënten.

7

RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK BIJ KLINISCHE PATIENTEN MET LEVERCIRROSE

Inleiding

In hoofdstuk 5 en 6 werden de resultaten vermeld van het onderzoek naar endotoxinemie bij patiënten opgenomen met acute hepatitis en bij poliklinische patiënten met levercirrose en een mesocavale shunt. Bij 9,5% van de patiënten behorend tot de laatste groep werd een endotoxinemie vastgesteld. De vraag is echter of dit percentage ook geldt voor patiënten die wegens complicaties bij levercirrose opgenomen worden en in minder goede conditie zijn. Om deze vraag te beantwoorden werd, bij een aantal patiënten behorend tot deze groep, de endotoxinemie-frequentie bepaald en werd tevens bestudeerd of endotoxinemie gepaard ging met o.a. gestoorde nierfunctie en veranderingen in bloedstolling (zoals trombocytenaantal, en prekalkreïnegehalte, zie hoofdstuk 4).

Ontwikkeling van ascites is één van de complicaties bij levercirrose. Meestal gelukt het met behulp van dieetmaatregelen en toediening van diuretica de ascites effectief te bestrijden. Voor probleemgevallen is het mogelijk d.m.v. een peritoneo-veneuze shunt volgens LeVeen de ascites te behandelen (LeVeen e.a. 1974). Daartoe wordt een intraperitoneale drain ingebracht, welke via een klepsysteem en een subcutaan geplaatste slang uitmondt in de vena jugularis externa of interna. Bij deze reïfusie-methode kunnen complicaties optreden, zoals koorts en vooral stollingsstoornissen met name intravasale stolling (Ansley e.a. 1978, Schwartz e.a. 1979). Omdat de mogelijkheid bestaat dat deze complicaties berusten op aanwezigheid van endotoxinen in ascites (Clemente e.a. 1977) werd hiernaar een onderzoek ingesteld.

Een bacteriële infectie van ascites bij patiënten met levercirrose gaat gepaard met een hoog totaal eiwitgehalte in ascites (Sherlock 1975b). Of de aanwezigheid van endotoxinen in ascites ook gepaard gaat met een hoog totaal eiwitgehalte in ascites is niet bekend.

Een hoog gammaglobulinegehalte in bloed zou beschermend kunnen werken tegen het optreden van endotoxinemie in bloed (hoofdstuk 6). Deze hypothese was aanleiding om ook in ascitesvocht het gammaglobulinegehalte te behapeln. Dit om te bepalen of er een relatie is tussen een laag gammaglobulinegehalte en de aanwezigheid van endotoxinen in ascites. De resultaten van het onderzoek naar endotoxinemie-frequentie, totaal eiwitgehalte en gammaglobulinegehalte in ascites bij

patiënten met levercirrose zullen worden vergeleken met die in ascites bij patiënten met peritonitis carcinomatosa of decompensatio cordis.

Patiënten en methoden

Levercirrose

In de periode 1 juli 1978 tot 1 november 1979 werd bij elke patiënt die met levercirrose opgenomen werd op de afdeling Inwendige Geneeskunde II onderzoek ingesteld naar endotoxinemie. Indien een patiënt in die periode meerdere keren opgenomen werd, telde alleen de eerste opname. In totaal werden 43 patiënten (27 mannen en 16 vrouwen) onderzocht. De gemiddelde leeftijd bedroeg 54,6 jaar (spreiding 20 tot 78). De meeste patiënten, te weten 86% van de groep, waren tussen de 40 en 70 jaar.

De diagnose cirrose werd steeds gesteld op grond van een leverbiopsie of in het recente verleden of tijdens de opname.

De oorzaak van de levercirrose was bij 23 patiënten overmatig alcoholgebruik, bij 4 chronische actieve hepatitis, bij 3 biliaire cirrose en bij 13 onbekend.

Bij de patiënten werd bloed afgenomen in de eerste week van opname op drie verschillende dagen en vervolgens twee keer per week. Bepaald werden trombocyten- en leukocytenaantal, creatinine, bilirubine, GOT, GPT, totaal eiwit en eiwitspectrum en endotoxinen. In de eerste week werd, een dag na parenterale toediening van 5 mg vitamine K, een stollingsonderzoek verricht. Bij 18 patiënten werd bloed afgenomen voor de bepaling van het prekallikreïnegehalte en tevens voor de normotest en de endotoxinenbepaling.

Een RES-functie meting werd bij 21 patiënten verricht in de eerste of tweede week van opname.

Ascites

In de periode 1 januari 1978 tot 1 januari 1980 werd in totaal bij 40 patiënten (26 mannen en 14 vrouwen) ascites verkregen. De meeste patiënten waren opgenomen op de afdeling Inwendige Geneeskunde II. Enkelen waren opgenomen op de afdeling Inwendige Geneeskunde I of III (hoofden respectievelijk Prof. Dr. J. Gerbrandy en Prof. Dr. J.C. Birkenhäger). De gemiddelde leeftijd van de patiënten bedroeg 58,5 jaar (spreiding 39 tot 79).

De oorzaak van de ascites was bij 7 patiënten peritonitis carcinomatosa, bij 4 decompensatio cordis en bij 29 een levercirrose.

Behalve ascitesvocht werd bij deze patiënten ook veneus bloed afgenomen. In bloed en ascitesvocht werden behalve endotoxinen, het totale eiwitgehalte en het eiwitspectrum bepaald. Het ascitesvocht werd tevens aëroob en anaëroob gekweekt.

Bepalingen

De bepaling van endotoxinen, prekallikreïne, en RES-functie werd verricht zoals

beschreven in hoofdstuk 4. De overige genoemde bepalingen werden verricht volgens routine technieken op het Bacteriologisch Laboratorium (hoofd: Prof. Dr. M.F. Michel), het Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium (hoofd: Prof. Dr. B. Leijnse) en het Laboratorium van de afdeling Hematologie (hoofd: Prof. Dr. J. Abels). Als routine methode voor de bepaling van totaal eiwit werd de geautomatiseerde versie van de biureetmethode gebruikt (apparatuur SMA 12/60, Technicon, voorschrift fabrikant). Het eiwitspectrum werd vervolgens elektroforetisch bepaald op cellulose-acetaat (veronal buffer pH 8,6, bonceauroodkleuring, densitometrische meting).

De resultaten in dit hoofdstuk zijn uitgedrukt als gemiddelden \pm SEM. Bij de vergelijking van groepen werd gebruik gemaakt van de ongepaarde en, waar van toepassing, de gepaarde t-toets van Student.

Resultaten

Endotoxinemie bij levercirrose

Laboratoriumuitslagen en klinische gegevens van patiënten met en zonder endotoxinemie. Endotoxinen werden, in één of meer van de 3 bloedmonsters afgenomen in de eerste week van opname, bij 20 van de 43 patiënten (46,5%) aangetoond. Bij opname waren 8 patiënten positief, bij de tweede afname 10 en bij de derde afname 12 patiënten. Deze toename is niet significant ($p = 0,23$). Van de 60 monsters die in de eerste week bij de 20 positieve patiënten verkregen werden, waren er 31 positief.

De gegevens van de bloedsuitslagen van de 20 positieve en de 23 negatieve patiënten staan vermeld in tabel 5. De patiënten met endotoxinemie hebben een significant lager gehalte aan totaal eiwit, gammaglobuline, fibrinogeen en met de normotest gemeten stollingsfactoren. Bij de groep patiënten met endotoxinemie is het gemiddelde aantal trombocyten lager dan bij de groep zonder endotoxinemie. Ook is het aantal trombocyten bij de patiënten met endotoxinemie in de eerste week van opname lager op de dagen met endotoxinemie dan op de dagen zonder endotoxinemie (fig. 19).

De waarden van bilirubine en creatinine zijn hoger bij de endotoxinenpositieve groep. Het gemiddelde serumcreatinine in de eerste week was bij 8 van de 20 positieve en 2 van de 23 negatieve patiënten groter dan de bovengrens van normaal, te weten $110 \mu\text{mol/l}$ ($p = 0,03$). Eén van de endotoxinen negatieve patiënten was bekend met een gestoorde nierfunctie (serumcreatinine circa $170 \mu\text{mol/l}$) en bij weglaten van deze patiënt verandert de p-waarde in $p = 0,01$. Het bilirubinegehalte in serum was groter dan $120 \mu\text{mol/l}$ (10 maal de bovengrens van normaal) bij 10 van de 20 positieve en bij 3 van de 23 negatieve patiënten ($p < 0,02$). De leeftijd van de positieve patiënten was niet significant verschillend van de negatieve patiënten (respectievelijk 52,0 en 56,9 jaar).

Tabel 5: Enkele laboratoriumuitslagen van patiënten met levercirrose.

Uitslagen als gemiddelden van de gemiddelde waarden per patiënt in de eerste week van opname ($\bar{x} \pm \text{SEM}$).

	endotoxinen + (n = 20)	endotoxinen – (n = 23)	p-waarde
trombocyten $10^9/l$	76 ± 8	180 ± 19	$< 0,001$
creatinine $\mu\text{mol/l}$	128 ± 23	88 ± 6	$< 0,10$
bilirubine $\mu\text{mol/l}$	173 ± 36	89 ± 30	$< 0,10$
GOT E/l	84 ± 13	78 ± 13	NS
GOT/GPT	$1,86 \pm 0,20$	$1,87 \pm 0,21$	NS
totaal eiwit g/l	$62,8 \pm 1,3$	$73,5 \pm 1,6$	$< 0,001$
albumine g/l	$34,5 \pm 1,1$	$36,7 \pm 1,6$	NS
γ globuline g/l	$16,1 \pm 1,4$	$20,2 \pm 1,0$	$= 0,02$
fibrinogeen g/l	$1,5 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,2$	$= 0,005$
normotest %	32 ± 3	57 ± 5	$< 0,001$

De aanleiding tot opname bij de positieve en negatieve patiënten was verschillend (tabel 6). Bij 12 van de 20 positieve patiënten was er sprake van encefalopathie. Dit was slechts bij 3 van de 23 negatieve patiënten ($p < 0,003$) het geval. Voorts vormde bij 10 van de 20 positieve patiënten een combinatie van problemen de aanleiding tot opname. Dit was slechts bij 2 van de 23 negatieve patiënten het geval ($p = 0,006$). Bloeding uit de tractus digestivus was in de positieve groep niet frequenter dan in de negatieve ($p > 0,3$).

Neomycine, ter behandeling of als profylaxe van encefalopathie, werd in de eerste week van opname door 13 van de 20 positieve en 6 van de 23 negatieve patiënten ($p < 0,002$) gebruikt.

Bij 9 van de 20 positieve patiënten en 4 van de 23 negatieve patiënten was de temperatuur in de eerste week bij opname hoger dan 38°C ($p < 0,10$). Het gemiddelde leukocytenaantal was niet significant verschillend tussen de twee groepen patiënten ($9,3 \pm 1,2 \times 10^9/l$ en $8,3 \pm 1,1 \times 10^9/l$).

De prognose bij patiënten met endotoxinemie

Van de 20 patiënten met endotoxinemie zijn er tijdens opname 11 overleden (55%). Van de 23 patiënten zonder endotoxinemie overleed 1 patiënt (4%) tengevolge van een cerebrovasculair accident. Dit verschil in mortaliteit is significant ($p =$

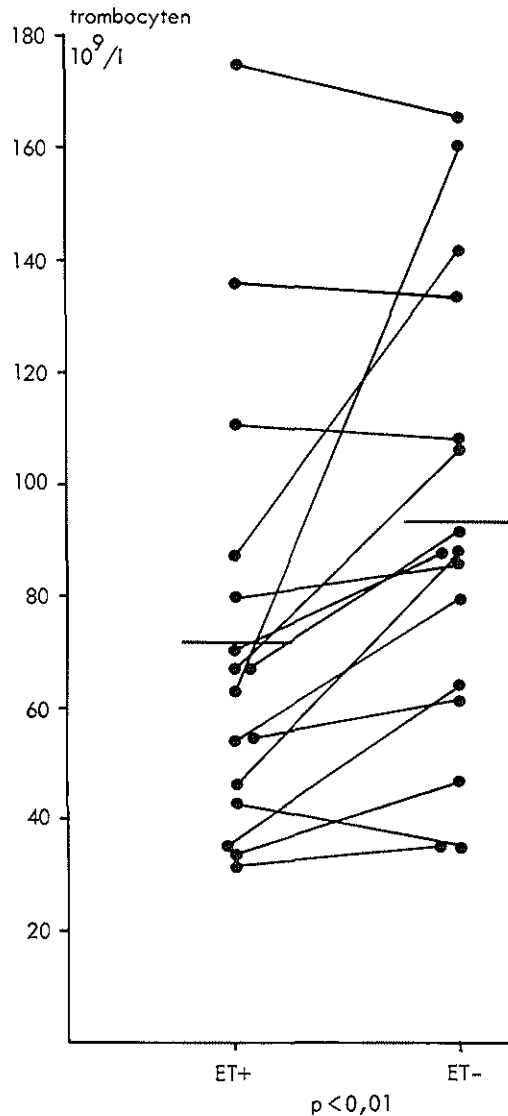


Fig. 19. Het aantal trombocyten tijdens een endotoxinemie-periode (ET+) en buiten een dergelijke periode (ET-) bij patiënten met levercirrose.

0,0005). Het totale aantal positieve endotoxinen-uitslagen in de eerste week is bij de 11 patiënten die overleden hoger dan bij de 9 patiënten die herstelden, doch het verschil is niet significant (respectievelijk 18 van 33 en 13 van 27 bepalingen). Van de 11 positieve patiënten overleden 2 patiënten aan sepsis, en de overige 9 aan de gevolgen van de varicesbloeding(en) en/of encefalopathie. Negen van de 11 patiënten overleden binnen twee weken na opname.

Tabel 6: De indicatie tot opname in het ziekenhuis van levercirrosepatiënten met en van levercirrosepatiënten zonder endotoxinemie in de eerste week van opname.

probleem bij opname	endotoxinen + patiënten	endotoxinen – patiënten	totaal
ascites en encefalopathie	6	2	8
tr. digestivus bloeding en encefalopathie	3	-	3
tr. digestivus bloeding en ascites	1	-	1
tr. digestivus bloeding	4	6	10
encefalopathie	3	1	4
ascites	1	6	7
leverfunctiestoornissen	1	5	6
andere	1	3	4
	20	23	43

Bij vergelijking van de gegevens van de 11 endotoxinenpositieve patiënten die tijdens opname overleden en van de 9 endotoxinenpositieve patiënten die herstelden blijkt het volgende.

Bij opname waren in het eerste bloedmonster respectievelijk bij 4 van de 11 en 4 van de 9 patiënten endotoxinen aantoonbaar. Aan het einde van de eerste week was dat bij respectievelijk 9 van de 11 en 3 van de 9 patiënten het geval. Hoewel er dus bij opname geen verschil is in endotoxinemie-frequentie is de frequentie aan het einde van de eerste week bij de patiënten die overlijden tijdens opname wel hoger ($p = 0,07$). Er was geen significant verschil in aantal patiënten die neomycine kregen in deze twee groepen.

De laboratoriumgegevens van de endotoxinenpositieve patiënten onderverdeeld in de twee categorieën staan vermeld in tabel 7. Wat opvalt is dat de patiënten met endotoxinemie die overlijden een nierinsufficiëntie ontwikkelen in tegenstelling tot de patiënten die herstellen. De overleden patiënten hadden een lagere normotestuïslag en lager gammaglobulinegehalte en een significant hoger bilirubinegehalte. Als we de opname-indicatie bekijken, dan blijkt dat van de 11 patiënten die overlijden er 9 een combinatie van de in tabel 6 genoemde problemen hadden in tegenstelling tot slechts bij 1 van de 9 die herstelden ($p = 0,005$).

Endotoxinemie bleef tijdens de opname aantoonbaar bij de patiënten die overleden. Dit in tegenstelling tot het verdwijnen van de endotoxinemie bij patiënten die

Tabel 7: Enkele laboratoriumuitslagen van levercirrosepatiënten met endotoxinemie die óf herstellen óf overlijden. Waarden als gemiddelden van de gemiddelde waarden per patiënt (behalve de piek-waarde van creatinine) in de eerste week van opname ($\bar{x} \pm \text{SEM}$).

	endotoxinen positief		p-waarde
	overleden	hersteld	
	n = 11	n = 9	
trombocyten $10^9/l$	73 ± 14	80 ± 9	NS
creatinine $\mu\text{mol/l}$ (gemiddelde 1e week)	164 ± 39	84 ± 6	$p < 0,10$
creatinine $\mu\text{mol/l}$ (piek in 1e week)	214 ± 48	101 ± 13	$p = 0,05$
creatinine $\mu\text{mol/l}$ (piek tijdens opname)	376 ± 52	104 ± 13	$p < 0,001$
bilirubine $\mu\text{mol/l}$	249 ± 56	74 ± 17	$p = 0,01$
totaal eiwit g/l	$62,9 \pm 1,9$	$62,7 \pm 1,8$	NS
normotest %	$28,0 \pm 4,0$	$37,5 \pm 5,1$	NS

herstelden. De 23 patiënten die in de eerste week van opname geen endotoxinemie hadden, bleven tijdens opname steeds endotoxinennegatief.

Plasma-prekallikreïnespiegel en endotoxinemie bij levercirrose

De prekallikreïnebepaling bij levercirrose. Het plasma-prekallikreïnegehalte, dat bij 18 van de 43 patiënten met levercirrose bepaald werd, bedroeg $42,7 \pm 5,6\%$ en was significant ($p < 0,001$) verschillend van de prekallikreïnewaarde bij 12 normalen ($85,3 \pm 6,6\%$ van het gehalte in een pool van normaal plasma). Het gehalte aan prekallikreïne in plasma bij levercirrose vertoonde een significante positieve correlatie met de normotestwaarde (zie fig. 20).

Prekallikreïne en endotoxinemie. Ten tijde van de eerste prekallikreïnebepaling tijdens opname hadden twee patiënten een endotoxinemie. Deze twee patiënten hadden de laagste prekallikreïne- en normotestwaarden van de gehele groep. Bij de verdere prekallikreïnebepalingen tijdens opname hadden 6 andere patiënten een endotoxinemie. Bij alle 8 was de endotoxinemie tijdelijk aanwezig.

De prekallikreïnewaarde bij opname van deze 8 endotoxinenpositieve patiënten

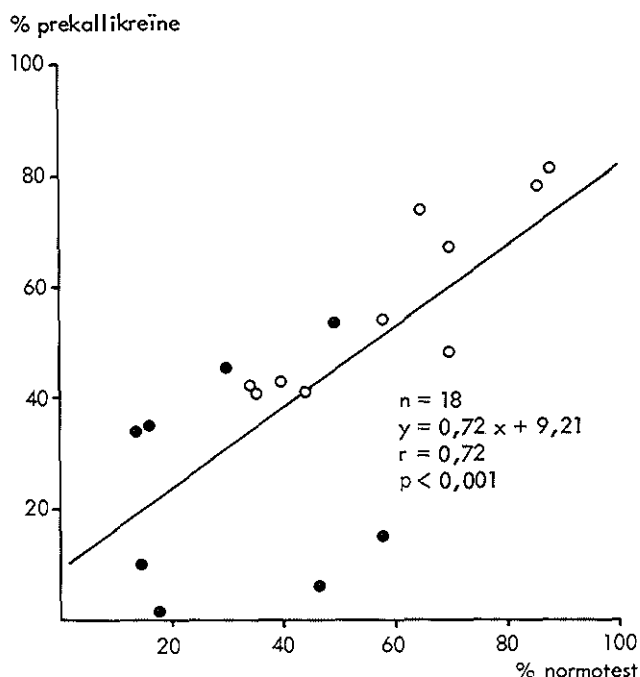


Fig. 20. Relatie tussen normotestpercentage en prekallikreïne-gehalte bij patiënten met levercirrose. De patiënten met endotoxinemie zijn aangeduid als • en de patiënten zonder endotoxinemie als ○.

werd vergeleken met die van de 10 endotoxinennegatieve patiënten en bleek bij de positieve patiënten significant lager te zijn ($25,0 \pm 6,8\%$ versus $56,9 \pm 5,2\%$, $p < 0,005$). Ook de normotest-uitslag was lager ($30,5 \pm 6,4\%$ versus $59,0 \pm 6,4\%$, $p < 0,01$). Zowel in de endotoxinenpositieve als in de endotoxinennegatieve groep was er geen significant verschil in de uitkomsten van de prekallikreïnebepaling en de normotest.

Worden de prekallikreïnewaarden tijdens een endotoxinemie-periode en buiten een dergelijke periode bij dezelfde patiënten met elkaar vergeleken (fig. 21) dan blijkt het prekallikreïnegehalte tijdens endotoxinemie lager te zijn ($p < 0,01$). De normotestwaarden zijn tijdens deze twee perioden niet verschillend (respectievelijk $32,0 \pm 9,0\%$ en $36,9 \pm 6,4\%$, $p > 0,25$).

Prekallikreïne-activatie bij levercirrose. In het plasma van 12 normale proefpersonen is de activatie van het in plasma aanwezige prekallikreïne maximaal na 5 minuten incubatie (5 minuten: $87,8 \pm 5,0\%$, 15 minuten: $85,3 \pm 6,6\%$ van het gehalte in een pool van normaal plasma). In het plasma van 18 patiënten met levercirrose daarentegen is de activatie maximaal na 15 minuten incubatie (5 minuten: $9,9 \pm 1,9\%$, 15 minuten: $42,7 \pm 5,6\%$, $p < 0,001$).

Bij vergelijking van de prekallikreïne-activatie bij 8 endotoxinenpositieve en 10 endotoxinennegatieve patiënten blijkt dat de activatiekinetiek bij deze twee groepen

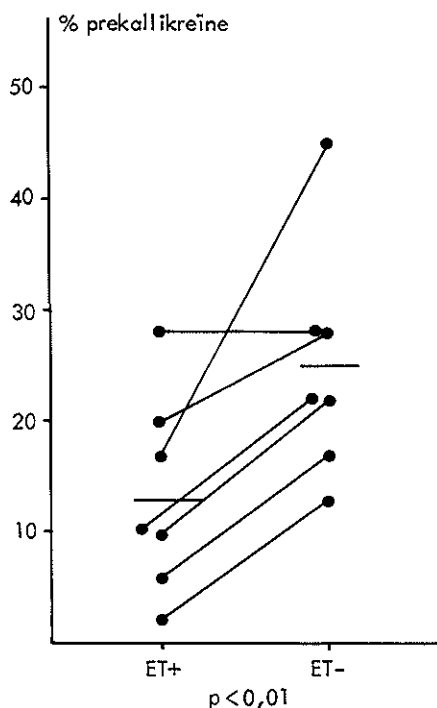


Fig. 21. Het prekallikreïne-gehalte tijdens een endotoxinemie-periode (ET+) en buiten een dergelijke periode (ET-) bij patiënten met levercirrose.

verschilt (zie fig. 22). Bij de endotoxinenegatieve patiënten is het gehalte geactiveerd prekallikreïne na 10 minuten activeren significant verschillend van het gehalte na 5 minuten activeren ($p < 0,001$, zie fig. 22). Langer activeren resulteert niet in een verdere stijging van geactiveerd prekallikreïne. Bij de endotoxinenpositieve patiënten stijgt het gehalte aan geactiveerd prekallikreïne geleidelijk na 5, 10 en 15 minuten activeren en de toename tussen 10 en 15 minuten was nog significant ($p < 0,05$).

RES-functie en endotoxinemie bij levercirrose

De $T/2$ van ^{99m}Tc -zwavel-colloïd die bij 21 patiënten bepaald werd, bedroeg $6,84 \pm 0,71$ minuten en is langer dan bij normalen ($5,92 \pm 0,40$ minuten). Het verschil is niet significant ($p = 0,30$). Van deze 21 patiënten hadden er 5 endotoxinemie in de eerste week van opname. Het verschil in $T/2$ bij de patiënten met en zonder endotoxinemie is niet significant (respectievelijk $7,35 \pm 1,63$ minuten en $6,69 \pm 0,81$ minuten, $p > 0,70$).

Bij 14 van de 21 patiënten die een meting van RES-functie ondergingen was er sprake van een alcoholische levercirrose en de $T/2$ was bij hen langer dan bij de andere 7 patiënten (respectievelijk $7,76 \pm 0,95$ minuten en $5,00 \pm 0,55$ minuten, $p < 0,10$) en de normalen ($p < 0,10$).

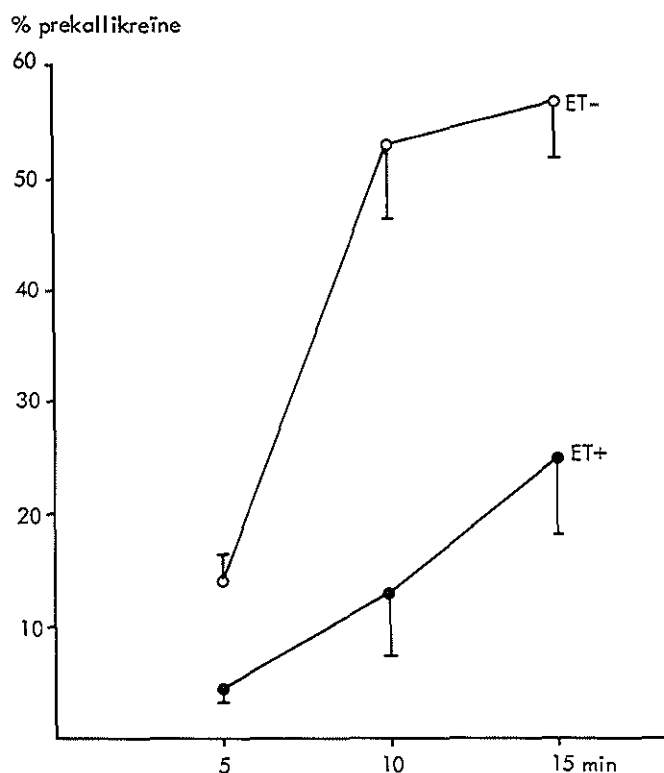


Fig. 22. Het gehalte aan geactiveerd prekallikreïne in plasma van patiënten met levercirrose na incubatie van het plasma met dextraansulfaat bij 0° C gedurende 5, 10 en 15 minuten. De gehalten zijn aangeduid als \bar{x} met SEM bij patiënten met (ET+) en zonder (ET-) endotoxinen in plasma.

Resultaten van de endotoxinenbepaling in ascites

Endotoxinenbepaling en bacteriekweek van ascites. Van de 61 ascitesmonsters waren er 50 afkomstig van patiënten met levercirrose en 11 van patiënten met peritonitis carcinomatosa of decompensatio cordis.

Bij één patiënt uit de groep van 11 werden endotoxinen aangetoond. Bij kweek werden bij geen van deze patiënten gramnegatieve bacteriën uit het ascitesvocht geïsoleerd.

Van de 50 ascitesmonsters van cirrosepatiënten, bleken er 6 endotoxinen te bevatten (12%). Uit 3 van deze 6 ascitesmonsters werden gramnegatieve bacteriën (*E. coli*) gekweekt. Bij 2 van deze 3 patiënten werd *E. coli* ook uit bloed geïsoleerd. Bij één van deze 3 patiënten met endotoxinen in ascites en een negatieve kweek was één week tevoren *E. coli* gekweekt uit bloed en ascites. Bij 2 van deze 3 patiënten waren

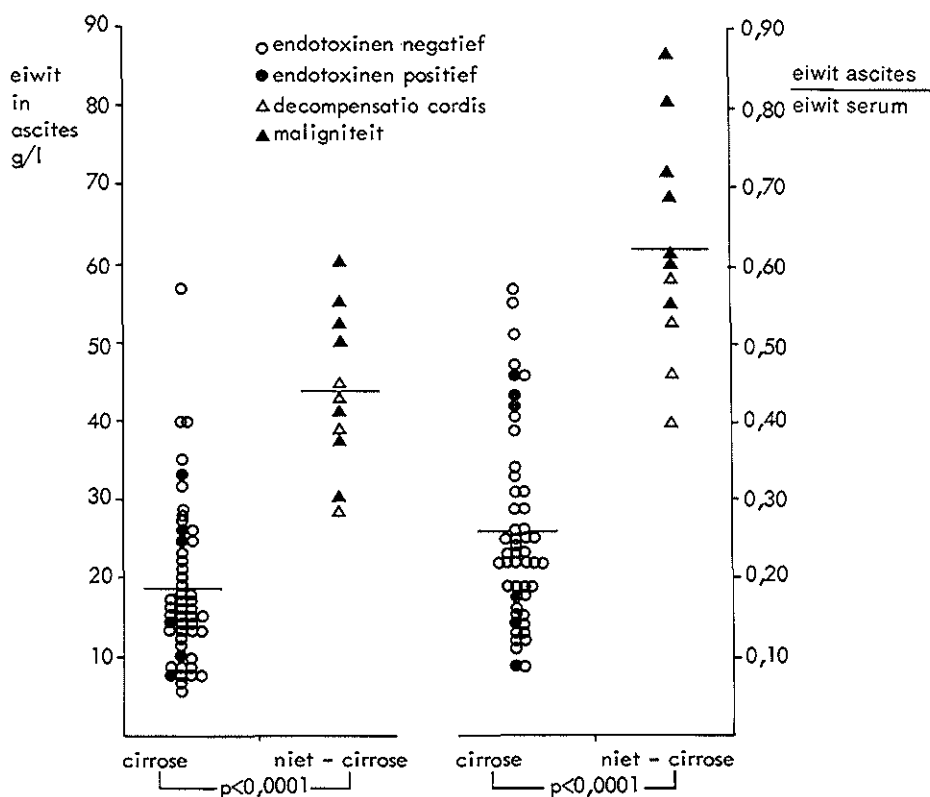


Fig. 23. Het eiwitgehalte in ascites en de ratio van eiwitgehalte in ascites en serum bij patiënten met ascites t.g.v. levercirrose of t.g.v. andere oorzaken.

endotoxinen in bloed aantoonbaar. Bij één van de 50 ascitesmonsters afkomstig van de patiënten met cirrose, was er bij kweek een duidelijke groei van grampositieve bacteriën (streptokokken) en endotoxinen werden in dat ascitesmonster niet aangetoond.

Ten tijde van de ascitesafname waren in 8 van de 50 gevallen in het bloed endotoxinen aantoonbaar en bij 3 van deze 8 tevens in ascites. Bij 3 van de 6 patiënten met endotoxinen in ascites was de lichaamstemperatuur op het moment van afname lager dan 37,5° C. Van de overige patiënten was de temperatuur op het moment van afname 38,0° C, 40,6° C en onbekend. Bij de patiënt zonder endotoxinen maar met grampositieve bacteriën in ascites bedroeg de temperatuur 37,9° C.

Ten tijde van de ascites-afname gebruikten 8 patiënten neomycine per os. Eén van hen had endotoxinen in de ascites. Bij hem waren één week tevoren gramnegatieve bacteriën uit bloed en ascites gekweekt.

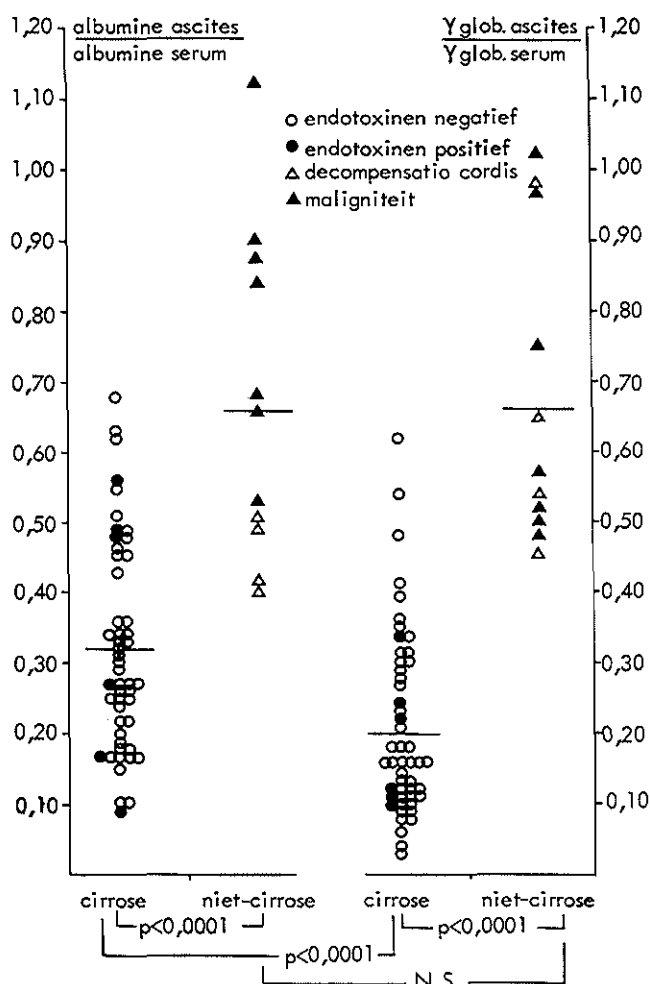


Fig. 24. De ratio van albumine in ascites en serum en de ratio van gammaglobuline in ascites en serum bij patiënten met ascites t.g.v. levercirrose of t.g.v. andere oorzaken.

Bepaling van endotoxinen en eiwit in ascites. Het gemiddelde totale eiwitgehalte in ascites was bij de patiënten met cirrose significant lager (18,6 g/l) dan bij de niet-cirrosepatiënten (43,9 g/l, zie fig. 23). Bij 6 van de 50 ascitesmonsters van cirrosepatiënten was het eiwitgehalte groter dan 30 g/l.

Bij patiënten met levercirrose is de frequentie van endotoxinemie in ascites met een totaal eiwitgehalte groter dan 30 g/l (1 van de 6) niet significant verschillend van de frequentie bij een eiwitgehalte lager dan 30 g/l (5 van de 44). Bij elk van de vier patiënten met een positieve kweek uit ascitesvocht was het eiwitgehalte lager dan 30 g/l. Het gemiddelde totaal eiwitgehalte van de endotoxinenpositieve ascites-

monsters van de cirrosegroep is niet significant anders dan dat van de endotoxinen-negatieve monsters (respectievelijk $19,2 \text{ g/l}$ en $18,5 \text{ g/l}$).

Het albuminegehalte in ascites bij de cirrosepatiënten verschilde van dat van de niet-cirrosepatiënten (respectievelijk $10,3 \pm 0,7 \text{ g/l}$ en $24,7 \pm 2,1 \text{ g/l}$, $p < 0,0001$). Ook het gammaglobulinegehalte was bij deze twee groepen verschillend (respectievelijk $4,3 \pm 0,5 \text{ g/l}$ en $7,9 \pm 1,0 \text{ g/l}$, $p < 0,005$). Voorts was het gammaglobulinegehalte in ascites van de levercirrosepatiënten niet significant verschillend bij de 6 endotoxinenpositieve monsters en de 44 endotoxinennegatieve monsters (respectievelijk $3,7 \pm 0,6 \text{ g/l}$ en $4,4 \pm 0,5 \text{ g/l}$).

De ratio van totaal eiwitgehalte in ascites en in serum was bij de cirrosepatiënten significant lager (zie fig. 23). Ook de ratio voor albumine in ascites en serum en van gammaglobuline in ascites en serum was bij de cirrosegroep significant lager dan bij de niet-cirrosegroep (zie fig. 24). Opvallend is dat bij de cirrosegroep de gammaglobuline-ratio significant lager is dan de albumine-ratio. Bij de niet-cirrosegroep is er geen verschil in albumine- en gammaglobuline-ratio.

Discussie

Bij 20 van de 43 (46,5%) patiënten met levercirrose werd in de eerste week van opname endotoxinemie vastgesteld. In hoofdstuk 6 werd beschreven dat endotoxinemie bij 2 van de 21 (9,5%) niet-klinische patiënten met levercirrose vastgesteld werd. Bij de hier beschreven 43 klinische patiënten werd dus een significant hogere frequentie van endotoxinemie vastgesteld. In de literatuur worden verschillende percentages genoemd waarbij endotoxinemie bij patiënten met levercirrose aangetoond werd. Zo vonden Wilkinson e.a. (1976) 51%, Prytz e.a. (1976) 48%, Liehr e.a. (1976) en Liehr en Grün (1977) 79%, Clemente e.a. (1977) 21%, Tarao e.a. (1977) 57%, Triger e.a. (1978) 10% en Fulenwider e.a. (1980) 0%. Belangrijke factoren voor deze verschillen in frequenties kunnen het stadium van de levercirrose zijn waarbij het onderzoek wordt verricht en het aanwezig zijn of optreden van complicaties bij de levercirrose. Zo was bijvoorbeeld de frequentie van gestoorde nierfunctie in de publicatie van Wilkinson e.a. (1976) 56%, van Liehr e.a. (1976) 78%, en van Clemente e.a. (1977) 21%. Door Prytz e.a. (1976), Tarao e.a. (1977), Triger e.a. (1978) en Fulenwider e.a. (1980) werden geen frequenties van gestoorde nierfunctie vermeld.

Bij de hier beschreven patiënten met endotoxinemie kwamen, in vergelijking met de patiënten zonder endotoxinemie, vaker verschijnselen voor die geduid worden als tekenen van leverinsufficiëntie zoals ascites, encefalopathie, stollingsstoornissen, hoog serumbilirubinegehalte en nierinsufficiëntie.

Bij de groep levercirrosepatiënten met endotoxinemie was er in vergelijking met de groep zonder endotoxinemie een slechtere nierfunctie, zoals gemeten aan een verhoging van serumcreatininegehalte, en voorts was er een hogere mortaliteit. De patiënten met endotoxinemie die geen gestoorde nierfunctie ontwikkelden werden endotoxinennegatief en herstelden. Bij degenen die overleden zijn bleef er sprake van endotoxinemie en ontstond er een progressieve nierinsufficiëntie. Ook volgens

andere onderzoekers is de mortaliteit bij patiënten met endotoxinemie significant hoger dan bij de patiënten zonder endotoxinemie (Wilkinson e.a. 1976, Clemente e.a. 1977, Tarao e.a. 1977). Evenals wij vonden Wilkinson e.a. (1976) en Clemente e.a. (1977) dat de mortaliteit vooral optreedt bij patiënten waarbij endotoxinemie gepaard gaat met een progressieve nierinsufficiëntie. Bij levercirrose is de nierdoorbloeding verminderd (Cavanagh e.a. 1970). Er is een sterke vasoconstrictie van de nierschors-arteriën (Epstein e.a. 1970, Kew e.a. 1971, Papper 1978, Gentilini e.a. 1980). Endotoxinen hebben een vaatvernauwende werking op de nierschors-arteriën (Epstein e.a. 1970, Papper 1978). Endotoxinen zijn dan ook één van de vele factoren, die voor de gestoorde nierfunctie bij levercirrose verantwoordelijk gesteld worden (Wong e.a. 1975, Papper 1978, Wong e.a. 1979, Gentilini 1980).

In ons onderzoek was bij patiënten met endotoxinemie vaker sprake van encefalopathie. Endotoxinen kunnen een bijdrage leveren aan deze encefalopathie (Liehr en Grün 1978). De invloed van endotoxinen op het koolhydraatmetabolisme lijkt daarbij van belang (zie hoofdstuk 3). Ook wordt beschreven dat endotoxinen hersenbeschadiging kunnen geven (Cooperstock e.a. 1975, Gilles e.a. 1976).

De patiënten met endotoxinemie hadden een hoger gehalte aan bilirubine in serum. De gehalten aan stollingsfactoren waren lager dan bij de endotoxinenegative patiënten. Clemente e.a. (1977) vonden een significant langere protrombinetijd bij patiënten met endotoxinemie. Dit duidt er op dat endotoxinemie vooral voorkomt bij levercirrosepatiënten met een slechte excretie- en synthese-functie van de lever. Endotoxinen op zich kunnen echter in experimentele omstandigheden beschadiging van hepatocyten geven (Heimbürger e.a. 1978, Liehr en Grün 1979, Nolan 1979). Het trombocytenaantal bij endotoxinenpositieve patiënten is lager dan bij de endotoxinnenegatieve patiënten. Ook de patiënten met endotoxinemie bij acute hepatitis hadden een lager trombocytenaantal en het is mogelijk dat dit een rechtstreeks gevolg is van endotoxinen (zie hoofdstuk 5).

Van de patiënten met endotoxinemie kreeg een significant hoger aantal patiënten neomycine. Dit hogere gebruik weerspiegelt de ernst van het leverlijden. De orale toediening van neomycine werd kort na opname gestart en blijkt dus niet te beschermen tegen het optreden van endotoxinemie. Het is echter mogelijk dat neomycine een onvoldoende afname geeft van de bacteriën die endotoxinen doen ontstaan. De meerderheidsflora van de darm bestaat namelijk uit gramnegatieve anaërobe bacteriën en deze bacteriën zijn nogal ongevoelig voor neomycine. Ook is het denkbaar dat bij het begin van de neomycine-toediening juist een toename van productie van endotoxinen uit gedode bacteriën in de darm plaatsvindt (Wilkinson 1977). Vanuit dit laatste oogpunt zou het gebruik van het antibioticum polymyxine te verkiezen zijn boven neomycine, omdat polymyxine tevens endotoxinen onschadelijk zou maken (Corrigan en Bell 1971, Palmer en Rifkind 1974).

Prekallikreïne en hoog molecuulair kininogeen spelen een belangrijke rol bij de activering van factor XII ofwel Hageman factor (Cochrane en Griffin 1979, Levinsky 1979). Bij leverziekten is het gehalte aan stollingsfactoren vaak verlaagd (Poller 1977, Fujii e.a. 1980). Verondersteld wordt dat de verlaagde prekallikreïnespiegel bij

levercirrose vooral het gevolg is van een verminderde synthese (Saito e.a. 1978, Wong 1978, Saito 1979). Bij de in dit hoofdstuk beschreven patiënten was het gehalte aan prekallikreïne in plasma verlaagd. Er was een positieve correlatie met het gehalte aan stollingsfactoren in plasma gemeten met de normotest, zoals ook beschreven werd door Stormorken e.a. (1978) en Wong (1978). De plasma-prekallikreïnespiegel was echter, bij dezelfde patiënten, significant lager tijdens een endotoxinemie-periode dan buiten een dergelijke periode. De uitslag van de normotest vertoonde in deze twee perioden geen significant verschil. Het verlaagde plasma-prekallikreïnegehalte bij levercirrose zou dus ook gedeeltelijk verklaard kunnen worden door het bestaan van endotoxinemie met mogelijk als gevolg een toegenomen verbruik van prekallikreïne (Van Vliet e.a. 1980a).

Bij de prekallikreïnebepaling wordt een incubatietijd van 7 minuten aangehouden om het prekallikreïne te activeren (Kluft 1978, Friberger e.a. 1979). Het gehalte aan geactiveerd prekallikreïne bij normalen is niet significant verschillend na 5 en 15 minuten activatie. Echter het gehalte aan geactiveerd prekallikreïne bij de in dit hoofdstuk beschreven levercirrosepatiënten is na 10 minuten incuberen hoger dan na 5 minuten incuberen. Na incubatie gedurende 15 minuten is het gehalte hoger dan na 10 minuten. De activiteit van prekallikreïne wordt geremd door C_1 -esterase-remmer, alpha-2-macroglobuline en antitrombine III (Kluft 1978, Friberger e.a. 1979, Levinsky 1979). Van deze remmers is het C_1 -esterase de belangrijkste (Saito e.a. 1978, Wong 1978, Friberger e.a. 1979). Het effect van deze remmer is minimaal bij de temperatuur van 0° C waarbij de prekallikreïneactivatie plaatsvindt. Voor de werking van prekallikreïne zijn factor XII en hoog molecuair kininogeen (HMK) als co-factor belangrijk (Chan e.a. 1976, Meier e.a. 1976, Cochrane en Griffin 1979). Bij levercirrose zijn de gehalten van deze twee co-factoren verlaagd (Wong 1978, Saito 1979). Het is bekend dat minstens 10% van het normale gehalte in plasma van factor XII en HMK voor de activering van prekallikreïne vereist is (Stormorken e.a. 1978, Friberger e.a. 1979). Indien de factor XII spiegel meer dan 37,5% bedraagt, vindt er een volledige activatie plaats. Van onze patiënten zijn de factor XII spiegels niet bekend. De normotest was lager dan 40% bij 8 van de 18 levercirrosepatiënten, waarbij prekallikreïne bepaald werd. Aannemend dat factor XII in dezelfde mate verlaagd is als de stollingsfactoren gemeten met de normotest, dan is daarmee de vertraagde activatie van prekallikreïne te verklaren.

De werking van het RES bij patiënten met levercirrose gemeten aan de snelheid waarmee intraveneus toegediend colloïd geklaard wordt, is niet verschillend bij patiënten met en zonder endotoxinemie. Ook bij acute hepatitis en bij levercirrose met een mesocavale shunt kon endotoxinemie niet worden verklaard op grond van een slechtere RES-functie gemeten met technetium-zwavel-colloïd (zie hoofdstuk 6). Een oorzakelijk verband tussen een slechte RES-functie en het optreden van endotoxinemie wordt echter wel steeds in de discussie in de literatuur genoemd (Wilkinson e.a. 1974, Prytz e.a. 1976, Liehr en Grün 1977). Echter, studies die een dergelijk verband bij mensen al dan niet aantonen zijn ons niet bekend. Overigens is de RES-functie bij levercirrose wel slechter dan bij normalen. Vooral bij

alcoholici bleek de RES-functie slechter dan bij de niet-alcoholici. Liu (1979) beschreef dat de door alcohol geremde RES-functie binnen één week na stoppen van alcoholgebruik significant verbetert. De in dit hoofdstuk beschreven RES-functie metingen werden in de eerste of tweede week van opname verricht. Op grond van de bevindingen van Liu (1979) zou het verschil van RES-functie tussen alcoholici en niet-alcoholici groter geweest zijn, indien de metingen bij onze patiënten binnen enkele dagen na opname waren verricht.

In hoofdstuk 6 beschreven we dat een verhoging van gammaglobuline in serum mogelijk een beschermende werking zou kunnen hebben op het ontstaan van endotoxinemie. Bij de cirrosepatiënten die in dit hoofdstuk werden beschreven was het gammaglobulinegehalte bij patiënten met endotoxinemie lager dan bij patiënten zonder endotoxinemie. Deze bevindingen lijken dus de veronderstelling beschreven in hoofdstuk 6 te steunen.

Reïfusie van ascites gaat in 50% van de gevallen gepaard met koorts (Lévy e.a. 1975, Ansley e.a. 1978). Daarbij kunnen ook stollingsstoornissen optreden (Lévy e.a. 1975, Ansley e.a. 1978, Matseshe e.a. 1978, Schwartz e.a. 1979). Het percentage gevallen waarbij intravasale stolling voorkomt varieert van 35 tot 70%. Endotoxinen worden als mogelijke oorzaak van deze complicaties genoemd. Bij slechts 12% van onze serie patiënten met levercirrose konden endotoxinen in ascitesvocht aangetoond worden. Op grond van dit percentage is het niet waarschijnlijk dat de aanwezigheid van endotoxinen in ascites de hoge frequentie van complicaties verklaart die bij reïfusie van ascites wordt waargenomen. Men bedenke echter dat de in de literatuur genoemde patiënten die met reïfusie werden behandeld niet op conservatieve behandeling reageerden. Het is mogelijk dat de endotoxinemie-frequentie bij deze patiënten anders is dan bij de hier beschreven groep die wel allen reageerden op de gebruikelijke conservatieve behandeling. Voorts worden er door andere auteurs aanzienlijk vaker endotoxinen in ascites aangetoond. De percentages variëren van 79 tot 88% (Clemente e.a. 1977, Liehr en Grün 1977, Tarao e.a. 1977). Door Tarao e.a. (1977) wordt tevens het percentage van hun groep patiënten genoemd waarbij systemische endotoxinemie aangetoond werd, namelijk 76%. Bij de, in dit hoofdstuk beschreven, serie patiënten met levercirrose en ascites bestond er bij 8 van de 50 (16%) een systemische endotoxinemie. Dit percentage (16) van endotoxinen in bloed komt overeen met het percentage (12) waarin endotoxinen in ascites aangetoond werd. Het blijkt dus dat de frequentie van endotoxinen in ascites en bloed met elkaar overeen komen. Verschillen in frequentie waarin endotoxinen in ascites aangetoond worden, kunnen mogelijk dus berusten op verschillen in endotoxinemie-frequentie in bloed.

Het percentage positieve kweken van ascitesvocht (8%) komt overeen met de percentages van 8 en 10,7% die in de literatuur genoemd worden (Conn en Fessel 1971, Bar-Meir e.a. 1979).

Eén van de 6 levercirrosepatiënten met endotoxinen in ascites had een eiwitgehalte in ascites hoger dan 30 g/l. Van de 34 patiënten met levercirrose en een eiwitgehalte in ascites lager dan 30 g/l waren bij 6 endotoxinen en/of bacteriën aanwezig. Bij een

eiwitgehalte hoger dan 30 g/l wordt van een exsudaat gesproken en dient aan de aanwezigheid van bacteriën gedacht te worden. Dus de infectie-frequentie verkregen bij ons onderzoek komt niet overeen met de zojuist genoemde regels.

Het totaal eiwitgehalte in ascites bij levercirrose bedroeg gemiddeld $18,6 \pm 1,4$ g/l. Volgens de literatuur is het eiwitgehalte in ascites niet hoger dan 20 g/l (Sherlock 1975b). Echter ook anderen beschreven een gemiddeld eiwitgehalte in ascites dat overeenkomt met de door ons gevonden waarde, namelijk 18,5 g/l (Boyer e.a. 1978) en 20 g/l (Bar-Meir e.a. 1979). Een eiwitgehalte in ascites hoger dan 30 g/l werd beschreven door Boyer e.a. (1978) en Galambos (1979b) in respectievelijk 17 en 25% der gevallen. Het eiwitgehalte bij 39 patiënten met geïnfecteerde ascites bedroeg 16,9 g/l (Bar-Meir e.a. 1979) en blijkt dus geen enkele diagnostische waarde te hebben voor het aantonen van geïnfecteerde ascites. Bar-Meir e.a. (1979) stellen dat een ascites dat de kenmerken van een "transudaat" heeft door infectie een geïnfecteerd transudaat wordt en niet een exsudaat.

De ratio van totaal eiwit in ascites en serum is volgens Galambos (1979b) lager dan 0,33. Boyer e.a. (1978) vonden bij 15 van de 100 patiënten een ratio groter dan 0,5. In ons onderzoek was deze ratio groter dan 0,33 in 22% en groter dan 0,50 in 4% der gevallen.

Bij levercirrose was de ratio van het albuminegehalte in ascites en in serum 0,32 en van het gammaglobuline 0,20. De ratio voor albumine verschilde significant van de ratio voor gammaglobuline. In ascites bij niet-cirrose patiënten was de verhouding van ascites en serum voor albumine 0,68 en voor gammaglobuline ook 0,68. Het blijkt dus ten eerste dat bij levercirrose de ratio's van albumine en gammaglobuline in ascites en serum lager zijn dan bij niet-cirrose patiënten. Dit verschil kan samenhangen met verschillen in de ontstaanswijze van ascites. Ten tweede is er bij cirrose een significant lagere ratio voor gammaglobuline dan voor albumine. Gammaglobuline lijkt dus moeilijker van bloed naar ascites te diffunderen. Mogelijk spelen de hoge molecuulmassa's van immuunglobulinen en het hoge gammaglobuline gehalte in het serum hierbij een rol. Wellicht zijn er ook verschillen in de ratio's voor de afzonderlijke immuunglobulinen. Henderson e.a. (1979) deelden mee dat de ratio van gehalte in ascites en plasma van fibrinogeen (molecuulmassa 341.000 dalton) lager was dan van plasminogeen (molecuulmassa 81.000 dalton).

Conclusie

1. Endotoxinemie werd vastgesteld bij 20 van de 43 klinische patiënten met levercirrose (46,5%).
2. De patiënten met endotoxinemie hadden in vergelijking met de patiënten zonder endotoxinemie een significant lager trombocytenaantal, lager gammaglobulinegehalte, lager fibrinogeengehalte en lager normotestpercentage.
3. Het aantal trombocyten is tijdens een periode met endotoxinemie significant lager dan buiten een dergelijke periode.

4. Endotoxinemie komt vooral voor bij patiënten met uitingen van slechte leverfunctie, zoals encefalopathie, stollingsstoornissen, verhoogd bilirubinegehalte, ascites en nierinsufficiëntie.
5. Het gebruik van neomycine "per os" beschermt niet tegen het optreden van endotoxinemie.
6. De mortaliteit tijdens opname is bij patiënten met endotoxinemie significant hoger dan bij patiënten zonder endotoxinemie (respectievelijk 55% en 4%).
7. Bij de endotoxinenpositieve patiënten die herstellen verdwijnt de endotoxinemie. De endotoxinenpositieve patiënten die overlijden waren echter steeds positief.
8. De endotoxinenpositieve patiënten die overlijden hebben, in vergelijking met hen die herstellen, een significant hoger gehalte aan bilirubine in serum. Zij ontwikkelen voorts een nierinsufficiëntie in tegenstelling tot patiënten die herstellen. De normotest-uitslag is niet significant verschillend bij deze twee groepen patiënten.
9. Bij patiënten met levercirrose is het prekallikreïnegehalte in plasma verlaagd en significant en positief gecorreleerd met de normotest-uitslag.
10. Tevens is het prekallikreïnegehalte tijdens een periode met endotoxinemie lager dan buiten een dergelijke periode.
11. De activatie van prekallikreïne is vertraagd bij patiënten met levercirrose.
12. De klaring van ^{99m} Technetium-zwavel-colloïd, als maat voor RES-functie, is bij patiënten met endotoxinemie niet slechter dan bij patiënten zonder endotoxinemie.
13. De werking van het RES bij alcoholische levercirrose is slechter dan bij normalen.
14. In 6 van de 50 ascites-monsters (12%) van patiënten met levercirrose werden endotoxinen aangetoond. Deze frequentie verschilt niet significant van de frequentie waarin endotoxinen in bloed werden aangetoond bij deze totale groep patiënten.
15. Het eiwitgehalte in ascites bij levercirrose bedroeg gemiddeld 18,6 g/l. Er is geen significant verschil in eiwitgehalte in ascites van patiënten met en zonder endotoxinen in ascites.
16. De bloed-ascites barrière voor gammaglobuline is groter dan voor albumine.

8

RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK NAAR ABSORPTIE UIT DE DARM VAN ENDOTOXINEN

Inleiding

Macromoleculen kunnen vanuit de darm geabsorbeerd worden (Cornell e.a. 1971, Warshaw e.a. 1974, Slesinger en Kim 1979). Dit is aangetoond voor stoffen als "horseradish peroxydase", albumine en ferritine, waarvan de molecuulmassa varieert van respectievelijk 40.000 tot 500.000 dalton. De absorptie werd aangetoond met behulp van radioactief gemerkte verbindingen of door middel van elektronen-microscopie.

Ook endotoxinen-macromoleculen kunnen uit de darm worden opgenomen. De gegevens hierover zijn voornamelijk gebaseerd op experimenten verricht omstreeks 1960, waarbij endotoxinemie optrad na het opwekken van een hemorrhagische shock bij proefdieren (zie hoofdstuk 2). Onlangs is absorptie van endotoxinen ook bij "gezonde" mensen waargenomen. De frequentie waarmee absorptie werd aangetoond varieerde in de verschillende series van 0% (Bailey 1976) tot bijna 100% (Jacob e.a. 1977).

Endotoxinen kunnen weliswaar uit de darm worden geabsorbeerd (zie hoofdstuk 2), maar het is niet bekend of endotoxinen uit dunne of dikke darm worden geabsorbeerd. Ook is de kennis over de factoren die van invloed zijn op de absorptie onvolledig. Zo is niet bekend of absorptie van endotoxinen bij portale hypertensie, bij alcoholgebruik of bij darmbeschadiging, zoals bij colitis, is toegenomen.

Levercirrose wordt meestal veroorzaakt door alcoholgebruik (Gips 1978, patiënten-gegevens hoofdstuk 6 en 7) en gaat gepaard met portale hypertensie. Bij levercirrose kan endotoxinemie voorkomen, zoals beschreven is in de voorgaande hoofdstukken. Gezien het feit dat bij portale hypertensie malabsorptie kan bestaan (Galambos 1979a) en dat bij alcoholgebruik darmslijmvliesbeschadiging met toegenomen absorptie van macromoleculen kan optreden, werd in een dierexperiment onderzocht wat de invloed op de absorptie van endotoxinen was van zowel portale hypertensie als van alcoholgebruik.

Cholestyramine vermindert mogelijk de absorptie van endotoxinen bij de rat (Nolan en Ali 1972). Over de invloed van neomycine en polymyxine op de absorptie van endotoxinen is weinig bekend. Neomycine is in dit verband van belang omdat het bij leverziekten regelmatig wordt toegepast. Van polymyxine is beschreven dat het endotoxinen onschadelijk maakt (Morrison en Jacobs 1976).

Het hiernavolgende onderzoek werd dan ook verricht om de mate van absorptie van

endotoxinen onder diverse omstandigheden na te gaan, zoals portale hypertensie, alcoholgebruik en colitis. Tevens werd de invloed van cholestyramine, neomycine en polymyxine B op de absorptie uit de darm van endotoxinen onderzocht.

Opzet en uitvoering van het onderzoek

Endotoxinen-absorptie bij de mens

Hiervoor werd bij 20 patiënten, zonder levercirrose, die een buikoperatie ondergingen, bloed afgenomen uit de vena portae of de vena mesenterica inferior of één van de grote takken van deze vaten, alsmede uit de vena cava. Van de 20 patiënten (13 mannen en 7 vrouwen) was de gemiddelde leeftijd 57,6 jaar (spreiding 23 tot 81 jaar). De reden voor de operatie was bij 12 een ernstig arteriële vaatlijden (het aanleggen van een bifurcatie-prothese of het verrichten van een desobstructie van de arteriae iliacae), bij 3 het verrichten van een maagoperatie, bij 3 een choledochus-exploratie en bij 2 een hemihepatectomie wegens een solitaire benigne levertumor. Bij geen van de patiënten was er sprake van oraal en/of parenteraal gebruik van antibiotica. Bij alle patiënten werd bloed afgenomen binnen één uur na het begin van de operatie. Het bloed werd steeds verkregen uit de venen, die wegens de aard van de operatie à vue waren of bereikbaar waren zonder extra prepareerwerk. Het afnemen van het bloed gaf nimmer aanleiding tot complicaties.

Behalve bij deze 20 patiënten werd er bij 5 patiënten met levercirrose, die wegens een bloeding uit oesofagusvarices een mesocavale shunt-operatie ondergingen, bloed afgenomen uit de vena portae of vena mesenterica superior en uit de vena cava. De leeftijd van deze patiënten (4 mannen en 1 vrouw) was gemiddeld 58,4 jaar (spreiding 44 tot 68 jaar). Drie van hen waren pre-operatief behandeld met neomycine per os. Endotoxinen in het plasma werden bepaald met de limulustest (zie hoofdstuk 4).

Endotoxine-absorptie bij de rat in vivo

Voor het onderzoek naar absorptie uit de darm van endotoxine werd gebruik gemaakt van met chroom-51 radio-actief gemerkt endotoxine (*E. coli* 0127: B 8, Difco), dat bereid was zoals beschreven in hoofdstuk 4. De absorptie uit de darm van endotoxine werd bij mannelijke Wistar ratten (circa 225 g, TNO, Zeist) op de volgende plaatsen en/of onder de volgende omstandigheden onderzocht:

- a. 6 ratten met een normale dunne darm
- b. 6 ratten die een alcoholhoudend dieet hadden gekregen
- c. 8 ratten met portale hypertensie
- d. 6 ratten met een normaal colon
- e. 8 ratten met een colitis.

Het alcoholhoudende dieet bestond uit drinkwater dat 15 g alcohol en 5 g glucose per 100 ml water bevatte. Deze alcoholconcentratie werd bereikt door dagelijks gedurende één week de toegediende hoeveelheid alcohol in het drinkwater te verhogen. Het alcoholhoudende drinkwater werd gedurende 4 tot 7 weken voorafgaande aan

het absorptie-onderzoek gegeven. Behalve dit drinkwater werd als voeding standaard rattenkorrels gegeven (Hope Farms, Woerden).

Een portale hypertensie bij de rat is te verkrijgen door het aanbrengen van een clip om de vena portae. Voor ons onderzoek werd echter de volgende techniek ontwikkeld. Eerst werd onder ethernarcose de vena portae à vue gebracht. Daarna werd een plastic catheter (Portex, uitwendige diameter 1 mm) langs deze vena gelegd en op twee plaatsen eraan vastgebonden (zie fig. 25). Door voorzichtig terugtrekken van de catheter lagen er twee lussen om de vena portae. Een dergelijke techniek is recent ook door anderen gepubliceerd (Van Thiel e.a. 1980) als een effectief diermodel voor portale hypertensie.

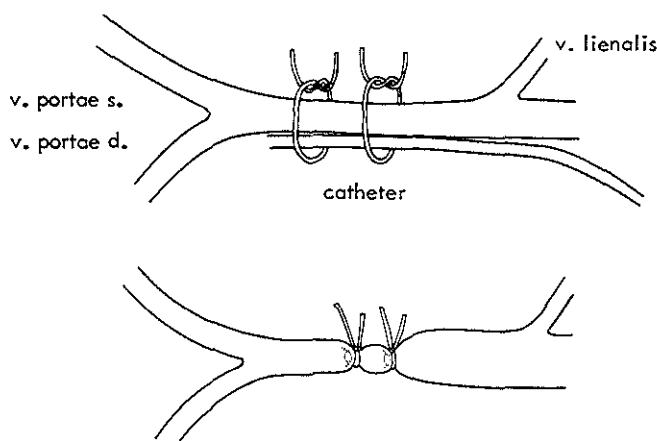


Fig. 25. Schema van de methode van opwekken van portale hypertensie.

Na stevig aantrekken van de twee ligaturen om de catheter en vervolgens voorzichtig terugtrekken van de catheter ontstaat de portale hypertensie.

De plaats van de lever hierbij is links en van de milt en darmen rechts. De linker en rechter tak van de vena portae is aangegeven respectievelijk met s. en d.

Een colitis werd onder lichte ethernarcose opgewekt d.m.v. rectale toediening van verdund azijnzuur (10%) zoals beschreven door MacPherson en Pfeiffer (1978). Bij alle met azijnzuur behandelde ratten ontstond binnen 24 tot 48 uur een duidelijke en bloedige diarree als uiting van de opgewekte colitis.

Het absorptie-onderzoek werd bij de ratten met portale hypertensie of colitis 7 tot 10 dagen na het aanbrengen van de genoemde afwijking verricht.

Bij het absorptie-onderzoek werd tijdens laparotomie onder ethernarcose via een catheter 2 mg radio-actief gemerkt endotoxine, opgelost in 1 ml glucose 5%, in een darmlus bestaande uit een op 2 plaatsen afgebonden darmsegment gebracht. Bij de darmlus van de dunne darm werd de proximale draad gelegd direct na de eerste jejunumilis en stevig aangetrokken. De distale draad werd op twee plaatsen kort bij

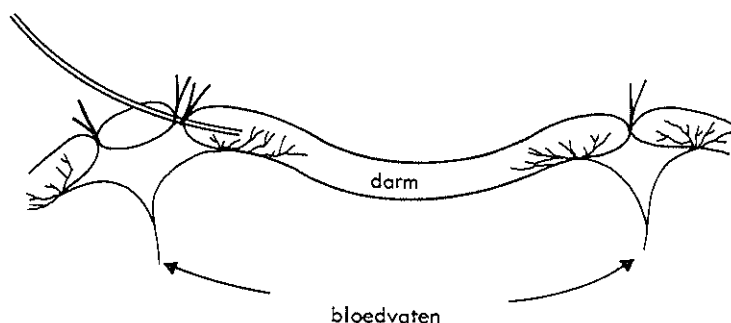


Fig. 26. Schema van het aanleggen van een darmlus (in vivo).

elkaar om de darm gelegd (zie fig. 26) ongeveer 20 cm van de proximale draad. De catheter (Portex, uitwendige \varnothing 1 mm) werd zodoende gefixeerd. Via deze catheter werd eerst de endotoxine-oplossing en daarna 0,25 ml lucht ingebracht. De catheter werd in situ gelaten, dicht bij de darmlus op meerdere plaatsen afgeklemd en vervolgens afgebonden.

De colonlus werd gemaakt nadat het colon, in tegenstelling tot het dunne darmsegment, voorzichtig schoon gespoeld was d.m.v. een fysiologische zoutoplossing ingebracht in het coecumgebied. Hierna werd een hechtdraad zover mogelijk distaal stevig om de darm gelegd en werden op vergelijkbare wijze als bij de dunne darmlus 10 cm proximaal daarvan de andere twee draden gelegd. Op dezelfde manier werd het endotoxine ingebracht en de catheter afgebonden.

Na het aanleggen en vullen van de darmlus werd de buik gesloten en de narcose beëindigd. De ratten waren binnen 5-10 minuten weer op de been. Twee uur later werden de ratten wederom onder narcose gebracht en werd via hartpunctie zoveel mogelijk bloed afgenomen. Vervolgens werden milt en lever verwijderd. Tenslotte werd de darmlus eruit gehaald en de lengte ervan gemeten (dunne darm \bar{x} 18,5 cm, spreiding 11 tot 27 cm, dikke darm \bar{x} 8,1 cm, spreiding 4,5 tot 12 cm). De radioactiviteit in bloed, lever en darmlus werd gemeten in een gammateller (Automatic Gamma System, Model 1185, Nuclear Chicago Division).

Endotoxine-absorptie bij dunne darmlussen van de rat in vitro

Onder narcose werden bij de rat twee stukken dunne darm van 15 à 20 cm verwijderd beginnend 5 cm vanaf het duodenum. De omgekeerde darmlus (everted gut sac) werd gemaakt zoals beschreven door Nolan e.a. (1977). De darm werd daarbij direct na het verwijderen in een oplossing van 0,154 M NaCl en 0,004 M KCL, geplaatst in ijs, gelegd. Hierna werd de darm omgekeerd over een glasstaaf zodat een "darm" verkregen werd waarbij de buitenlaag bestond uit mucosa i.p.v. serosa. Het ene uiteinde werd afgebonden en via het andere uiteinde werd met een Record spuit 0,75 ml darmlusoplossing ingebracht. Deze oplossing bestond uit 0,147 M NaCl, 0,1 mM

CaCl₂, 0,04 M glucose en 0,004 M tris-HCl. De pH hiervan werd d.m.v. geconcentreerd HCl op 7,2 gebracht en de uiteindelijke osmolariteit bedroeg 320 mOsmol/kg. De tweede ligatuur werd gelegd op 10 cm vanaf de eerste afbinding. De darmlus werd in een 25 ml Erlenmeijer gelegd die 4,5 ml darmlus-oplossing met gemerkt endotoxine bevatte. De endotoxine-concentratie bedroeg 2 mg per ml. De gehele procedure van uitnemen van dunne darm tot het onderdompelen in de endotoxine-oplossing duurde 10 tot 15 minuten. De incubatie vond plaats gedurende 2 uur bij 37° C in een schudwaterbad waarbij boven de oplossing in de Erlenmeijer via een catheter zuurstof werd gebracht (100% O₂, 0,25 liter per minuut). Na de incubatie werd de oplossing met behulp van een 22 G naald uit de darmlus verwijderd. De hoeveelheid radio-activiteit van de darmlushoud, de incubatie-oplossing en de darmlus zelf werd gemeten in een gammateller. De experimenten werden herhaald om de invloed van medicamenten op de absorptie te onderzoeken. Aan de endotoxine-oplossing werd hiervoor 200 mg cholestyramine, 10 mg neomycine, 50 mg polymyxine B of 5 mg polymyxine B toegevoegd. De toename in osmolariteit door deze medicamenten bedroeg minder dan 10%. Deze oplossing werd in een Erlenmeijer gedurende 1½ uur op 37° C gehouden. Daarna werd de omgekeerde darmlus er ingelegd en volgde het onderzoek naar absorptie van endotoxine.

Berekening van endotoxine-absorptie in vivo en in vitro

De radio-activiteit in de genoemde organen of oplossingen werd gemeten evenals de achtergrondstraling. Met behulp van de t-toets van Student voor twee gemiddelden werd berekend of het verschil significant was. Op grond hiervan was bij de diverse experimenten een minimum-absorptie variërend van 0,02 tot 0,06 µg gemerkt endotoxine vereist om aldus van significantie te kunnen spreken.

Resultaten

Patiënten

Endotoxinen werden aangetoond in de vena portae bij 3 van de 8, in de vena mesenterica inferior bij 2 van de 12 patiënten. Het verschil in frequentie van endotoxinemie in de vena portae en vena mesenterica inferior is niet significant. Totaal werd er dus bij 5 van de 20 patiënten (25%) absorptie van endotoxinen aangetoond. In de vena cava werden bij geen van de 20 patiënten endotoxinen aangetoond. Het verschil frequentie van endotoxinemie in de vena cava en de portale vaten is significant ($p < 0,05$).

Bij 3 van de 5 patiënten met levercirrose die een shunt-operatie ondergingen, werden endotoxinen in de vena portae of de vena mesenterica superior aangetoond. Bij 4 van de 5 patiënten waren er tevens endotoxinen aantoonbaar in het bloed van de vena cava. De frequentie van endotoxinemie in portale vaten van cirrosepatiënten is niet

verschillend van patiënten zonder cirrose ($p = 0,30$). Bij cirrose van de lever is er in de vena cava een significant hogere frequentie van endotoxinemie vergeleken met die bij de niet-cirrosepatiënten ($p < 0,001$).

Dierproeven

Endotoxine-absorptie in vivo. Bij normale ratten kon in 4 van de 6 gevallen endotoxine-absorptie aangetoond worden m.b.v. de dunne darmlus-techniek (zie tabel 8). De frequentie van endotoxine-absorptie was bij ratten met portale hypertensie of na alcoholdieet niet groter dan bij normale ratten. In totaal werd endotoxine-absorptie vanuit de dunne darm bij 13 van de 20 ratten (65%) aangetoond. Endotoxine was bij 9 van de 20 ratten in de lever aantoonbaar, en bij 8 van hen eveneens in de milt. De totale aangetoonde hoeveelheid endotoxine in de lever was gemiddeld 5 keer (sprei-

Tabel 8: Absorptie van endotoxine (uitgedrukt als μg per 10 cm darm in 2 uur) in vivo bij de rat uit dunne darmlussen gevuld met 2 mg chroom-51 gemerkt endotoxine opgelost in 1 ml glucose 5%.

type rat	volgnummer van de rat	μg endotoxine in		
		lever	milt	bloed
normalen	1	0,48	0,03	0,05
	2	2,16	0,45	0,25
	3	0,04	0,02	0,06
	4	-	-	0,02
	5	-	-	-
	6	-	-	-
alcoholdieet	1	20,48	3,43	14,62
	2	-	-	-
	3	0,01	0,01	0,04
	4	-	-	0,03
	5	-	-	-
	6	0,12	0,05	0,04
portale hyper- tensie	1	0,09	0,03	0,03
	2	-	-	-
	3	-	-	-
	4	0,09	0,03	0,03
	5	-	-	-
	6	-	-	0,02
	7	-	-	-
	8	0,04	-	0,02

- d.w.z.: geen significante absorptie aantoonbaar

ding 1 tot 14) zo groot als in de milt. De hoeveelheid endotoxine in de lever was ook in alle gevallen op één na groter dan in het bloed. Daarentegen was bij 4 van de 20 ratten endotoxine in het bloed aantoonbaar doch niet in de lever of in de milt.

Bij 4 van de 6 ratten kon vanuit de dikke darmlus in vivo absorptie van endotoxine aangetoond worden (zie tabel 9). Bij de 8 ratten waarbij tevoren een colitis opgewekt was, werd bij 6 endotoxine-absorptie aangetoond. De lengte van de gebruikte darmlus bij ratten met of zonder colitis was gelijk. Wel was bij 4 van de 8 ratten met colitis de aangetoonde totale endotoxine-absorptie groter dan 1,5 μg . Deze waarde werd bij geen van de ratten met een normaal colon gevonden ($p < 0,15$). Van de totale groep van 26 ratten waarbij absorptie via dunne of dikke darmlus (zonder colitis) bepaald werd, was bij 2 van hen de absorptie groter dan 1,5 μg . Van de 8 ratten met colitis werd dit bij 4 ratten waargenomen ($p = 0,03$).

Tabel 9: Absorptie van endotoxine (uitgedrukt als μg per 10 cm darm in 2 uur) in vivo bij de rat uit dikke darmlussen gevuld met 2 mg chroom-51 gemerkt endotoxine opgelost in 1 ml glucose 5%.

type rat	volgnummer van de rat	μg endotoxine in		
		lever	milt	bloed
normalen	1	-	-	-
	2	-	0,08	0,11
	3	-	0,08	0,11
	4	0,08	0,14	0,09
	5	1,27	-	-
	6	-	-	-
colitis	1	0,40	-	-
	2	7,83	0,53	9,67
	3	-	-	0,10
	4	1,03	0,07	0,43
	5	-	-	-
	6	11,70	2,09	3,51
	7	-	-	0,11
	8	4,00	0,54	0,62

- d.w.z.: geen significante absorptie aantoonbaar

Endotoxine-absorptie in vitro. Bij de geïsoleerde en vervolgens omgekeerde dunne darm werd met een lus van 10 cm bij 7 van de 7 lussen absorptie van endotoxine aangetoond (zie fig. 27). Gemiddeld bedroeg het gehalte endotoxine in de lus 11,4 μg (spreiding 3,5 tot 26,9). Van de totale hoeveelheid van 9 mg endotoxine beschikbaar in de incubatie-vloeistof werd dus 1,3 o/oo (spreiding 0,4 tot 3,3) opgenomen.

Bij de in vivo absorptie-proeven werd slechts bij 2 van de 20 ratten meer dan 0,4 o/oo opgenomen per 10 cm dunne darmlus ($p < 0,0001$).

De absorptie van endotoxine werd tevens nagegaan nadat cholestyramine, neomycine of polymyxine B aan de endotoxine-oplossing toegevoegd was (zie fig. 27). Hierbij bleek dat cholestyramine in de gebruikte dosering geen invloed had op de endotoxine-absorptie. Neomycine of polymyxine B deden de endotoxine-absorptie verminderen met een factor van gemiddeld 2,5 (spreiding 1,9 tot 3,3). Het verschil in absorptie is echter statistisch niet significant. Het is echter mogelijk dat bij een uitbreiding van het aantal waarnemingen de verschillen significant zouden kunnen worden.

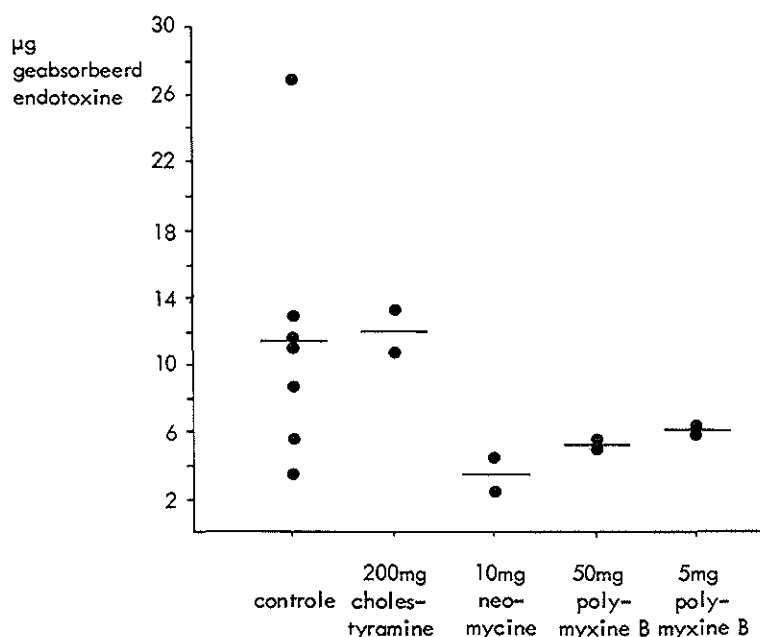


Fig. 27. Absorptie van endotoxine bij een dunne darmlus in vitro met en zonder toevoeging van medicamenten.

Overig onderzoek verricht bij de endotoxine-absorptie-experimenten. Het gewicht van de milt van de 8 ratten waarbij een portale hypertensie was opgewekt bedroeg 607 ± 79 mg. Dit is 50% zwaarder dan bij 10 niet-geopereerde ratten van gelijke leeftijd. Het gewicht van de milt bij ratten met portale hypertensie was ook zwaarder (38%) dan bij 8 ratten die een schijnoperatie ondergingen ($p < 0,001$). Bij de obductie van ratten met portale hypertensie waren er macroscopisch geen tekenen van vena portae-trombose. Bij lichtmicroscopisch onderzoek (Drs. F.J.W. ten Kate, afdeling Pathologische Anatomie I, hoofd: Prof. Dr. R.O. v.d. Heul) toonde de lever geen afwijkingen. In de milt werden tekenen van stuwung aangetroffen.

In het colon werden microscopisch na het opwekken van een colitis sterke afwijkingen gezien. De mucosa toonde uitgebreide ulceratie, die plaatselijk tot aan de muscularis mucosae reikte. In de nog aanwezige mucosadelen werd een sterk oedeem en een dicht infiltraat bestaande uit lymfocyten, plasmacellen en vnl. segmentkernige granulocyten aangetroffen. Dit infiltraat breidde zich in wisselende mate uit in diepere lagen van de colonwand. Plaatselijk bereikten de lesies de serosa. Hier toonde het peritoneum een fibrinopurulent beslag. Het darmlumen was grotendeels gevuld met purulent materiaal. Bij deze ratten werden in de lever in meerdere portale velden ontstekingsinfiltraten gezien. In het leverparenchym werden voorts verspreid enkele degenererende hepatocyten, waaronder "councilman-like bodies" aangetroffen.

De geïsoleerde dunne darmlussen toonden bij lichtmicroscopisch onderzoek mechanisch beschadigd oppervlakte-epitheel vnl. op de toppen van de villi. Na incubatie konden microscopisch geen duidelijk ischemische veranderingen van het darmwandepitheel worden aangetoond.

Discussie

Bij 5 van de 20 (25%) patiënten werden bij operatie endotoxinen aangetoond in bloed van de vena portae of de vena mesenterica inferior of de grotere takken van de vena mesenterica inferior. Een soortgelijke frequentie werd gevonden door Triger e.a. (1978). Overigens varieert de frequentie van portale endotoxinemie van 0 tot 97% (zie tabel 10). De waargenomen verschillen kunnen berusten op verschillen in de uitvoering en de aflezing van de limulustest. Ook de plaats van bloedafname wisselt, waarbij sommigen het bloed verzamelen uit de vena portae, anderen uit de vena

Tabel 10: Overzicht van de frequentie van portale en tevens systemische endotoxinemie.

auteur(s)	aantal patiënten	portale endo-toxinemie	systemische endo-toxinemie	plasma voor-behandeling
Prytz e.a. 1976	21	9	-	verdunnen
Bailey 1976	16	0	0	chloroform
Jacob e.a. 1977	34	33	4	verdunnen (1/3) en koken
Triger e.a. 1978	30	7	0	chloroform
dit proefschrift	20	5	0	verdunnen (1/10) en koken
	121	54 = 44,6%	4 = 7,4%	

mesenterica superior en/of vena mesenterica inferior. Bij het onderzoek van Jacob e.a. (1977) hadden 16 van de 34 patiënten een niet-intacte mucosa van het colon (ulcererende colitis of coloncarcinoom). Tevens kregen al hun patiënten pre-operatief oraal 4 x 1 gram kanamycine per dag gedurende 2 dagen.

Bij geen van onze patiënten zonder leverziekte was er sprake van endotoxinemie in de vena cava. Over de plaats van verwijdering uit bloed van endotoxinen valt uit dit onderzoek niets te zeggen. Triger e.a. (1978) vonden dat van hun 7 patiënten met portale endotoxinemie bij geen van hen endotoxinen in de venae hepaticae aanwezig waren. Deze waarneming komt goed overeen met de belangrijke rol van het RES m.n. van de lever bij de klaring van het bloed van endotoxinen (zie hoofdstuk 2). Vier van de 33 patiënten in het onderzoek van Jacob e.a. (1977) hadden behalve een portale ook een perifere systemische endotoxinemie. Van deze 4 patiënten hadden er 3 een duidelijk gestoorde leverfunctie en de andere had een gramnegatieve sepsis. Bij onze 5 patiënten met levercirrose, die een mesocavale shunt-operatie ondergingen, waren bij 4 endotoxinen in het bloed aantoonbaar. Bij deze hoge frequentie spelen mogelijk meerdere factoren een rol. Naast een onvolledige verwijdering van endotoxinen uit het bloed is wellicht de absorptie uit de darm verhoogd als gevolg van een recente periode van hypotensie. De werking van de lever en het RES kan door de narcose en de operatie verminderen (Löfström en Schildt 1974, Massarrat en Massarrat 1979). Bij levercirrose is de fagocytose-capaciteit van het RES verminderd (zie hoofdstuk 6). Of er bij levercirrose een verhoogde absorptie uit de darm van endotoxinen bestaat is niet bekend.

Bij het hier beschreven onderzoek naar absorptie van endotoxinen werd het bloed niet onderzocht op bacteriegroei. Jacob e.a. (1977) kon bij 1 van de 11 patiënten met portale endotoxinemie ook *E. coli* bacteriën aantonen in het portale bloedmonster. Ook uit andere studies (zie tabel 11) blijkt dat portale bacteriëmie in geringe frequentie kan voorkomen. Uit de tabellen 10 en 11 blijkt dat de frequentie van portale endotoxinemie (54 van 121) significant hoger is dan die van bacteriëmie (27 van 407) in portaal bloed ($p < 0,0001$, chi-kwadraattoets). Het bezwaar van deze vergelijking van frequenties is echter wel dat de frequenties niet afkomstig zijn van dezelfde groep patiënten.

Het percentage positieve kweken met gramnegatieve bacteriën bedroeg 18,5% van het aantal positieve kweken ofwel 1,2% (5 van 407) van het totaal aantal kweken. De portale bacteriëmie werd meestal door de diverse auteurs toegeschreven aan contaminatie. Een endotoxinemie in portaal bloed moet dus verklaard worden door absorptie van endotoxinen en niet door een portale gramnegatieve bacteriëmie.

Zowel in vivo als in vitro kon in het dierexperiment absorptie van radio-actief endotoxine worden aangetoond. De geabsorbeerde radio-activiteit werd in ons onderzoek omgerekend in microgrammen endotoxine. In het gebruikte endotoxine-preparaat was de hoeveelheid vrij chroom-51 minder dan 0,05%. De absorptie uit de darm van chroom-51 (-chloride) opgelost in een fosfaatbuffer (pH 7,2) was minder dan 0,5% in 2 uur. Ook Mertz (1976) en Prasad (1978) beschreven dat chroom slecht opgenomen wordt uit de darm. De eventuele absorptie van vrij chroom in ons onder-

Tabel 11: Overzicht van de frequentie van positieve kweken (aëroob en anaëroob) voor bacteriën van menselijk portaal bloed.

auteur(s)	afnametechniek	aantal patiënten	aantal positieve kweken	aantal kweken met gramnegatieve bacteriën
Coblentz e.a. 1954	transhepatisch	32	3	0
Schatten e.a. 1955	laparotomie	23	8	2
Taylor 1956	v. portae catheterisatie	21	10*	2*
Orloff e.a. 1958	laparotomie	101	0	0
Dencker e.a. 1974	v. portae catheterisatie	24	1	0
Prytz e.a. 1976	v. portae catheterisatie	21	1	0
Jacob e.a. 1977	laparotomie	11	1	1
Triger e.a. 1978	transhepatisch	28	3	0
totaal		261	27	5
frequentie			27/407 = 6,6%	5/27 = 18,5%

* Afkomstig van een totaal van 167 bloedmonsters

zoek is dus minder dan 0,5% van 0,05% van de totale hoeveelheid toegediend endotoxine, ofwel verwaarloosbaar. Voorts hebben Nolan e.a. (1977) aangetoond dat het geabsorbeerde radio-actieve endotoxine biologisch actief is.

Uit de in dit hoofdstuk beschreven experimenten bij de rat blijkt dat er in vivo geen verschil is in absorptie van endotoxine per gelijke lengte dunne of dikke darm. Het gehalte aan gramnegatieve bacteriën in de dikke darm is groter dan in de dunne darm. Gezien deze grotere potentiële bron van endotoxinen in de dikke darm zal absorptie van endotoxinen in vivo waarschijnlijk voornamelijk in het colon plaatsvinden. Indien er een colitis bestaat zal er een grotere mate van absorptie plaatsvinden.

Bij levercirrose komt vaak malabsorptie voor (Galambos 1979a). Door de portale hypertensie kan de mucosa van de darm veranderen. Echter ook alcohol kan slijmvliesafwijkingen van de dunne darm geven (Worthington e.a. 1978, Fox e.a. 1978) en de opname van macromoleculen verhogen (Worthington e.a. 1978). In ons onderzoek gaf portale hypertensie of het gebruik van drinkwater met 15 g% alcohol geen toename van de endotoxine-absorptie. Het is mogelijk dat deze alcohol-concentratie te laag is geweest om de endotoxine-absorptie te beïnvloeden. Bij

levercirrose is het aantal bacteriën in jejunum en ileum verhoogd (Martini e.a. 1957, Gorbach e.a. 1970). Theoretisch zou een dergelijke toename gepaard kunnen gaan met een toename in hoeveelheid geabsorbeerd endotoxine.

De absorptie van endotoxine in vitro is significant hoger dan in vivo. De opname van endotoxine via de rattedarm is in vitro 1,3 o/oo van de totale hoeveelheid endotoxine in 4,5 ml badwater. Of anders gezegd 5,9 o/oo van de aanwezige hoeveelheid endotoxine per ml. Dit laatste komt overeen met de 5,0 o/oo absorptie beschreven door Nolan in 1975. De absorptie in vivo bedroeg bij 18 van de 20 metingen minder dan de laagste in vitro absorptie ofwel minder dan 0,4 o/oo van de hoeveelheid endotoxine per ml. Dit verschil is heel duidelijk significant. Hoewel Nolan e.a. (1977) geen veranderingen in de darmwand konden vaststellen die kunnen worden toegeschreven aan de absorptie van endotoxinen, is het wel waarschijnlijk dat er veranderingen kunnen ontstaan door manipulatie van het preparaat en door zuurstofgebrek. Het is bekend dat de metabole toestand van darmepitheelcellen van geïsoleerde omgekeerde darmlussen slecht is tengevolge van de slechte zuurstofvoorziening (Iemhoff e.a. 1970). Bij een tweetal darmlussen die tijdens ons in vitro onderzoek werden gebruikt en waarbij de zuurstofvoorziening gebrekkig was, kon een sterke stijging van de absorptie van endotoxine worden geconstateerd (gemiddeld 60, i.p.v. 11,4 μ g). Ook Shute (1977) toonde aan dat zuurstof belangrijk is voor een intacte mucosabarière.

Bij absorptie in vitro moet endotoxine de gehele darmwand passeren. Bij absorptie in vivo kunnen endotoxinen via de bloedvaten die zich vlak onder het epitheel bevinden worden opgenomen en verder worden getransporteerd. Desondanks is de absorptie in vitro groter dan in vivo. Over de wijze waarop endotoxinen via de darmwand worden opgenomen is niet veel bekend. Uit onderzoeken van Cornell e.a. (1971), Warshaw e.a. (1974) en Worthington e.a. (1978) is bekend dat macromoleculen zowel via pinocytose door de cel als via de intercellulaire ruimte de epitheel laag van de darmmucosa kunnen passeren. Opname van endotoxinen is te verklaren met passieve diffusie (Ravin e.a. 1960, Gans en Matsumoto 1974). Volgens Nolan e.a. (1977) bestaat er voor endotoxine-absorptie een verzadigbaar transportsysteem.

Aangetoond werd dat de in vitro absorptie van endotoxine gemeten over een periode van 2 uur in aanwezigheid van neomycine of polymyxine B gemiddeld met een factor 2,5 verminderde. Deze vermindering was echter niet significant. Cholestyramine gaf in dezelfde proefopstelling geen enkele verandering in absorptie van endotoxine. Nolan en Ali (1972) suggereerden dat cholestyramine wel een vermindering in absorptie (p was 0,10 bij niet verdelingsvrije toetsing!) teweegbrengt. Polymyxine B maakt endotoxinen onwerkzaam (Corrigan en Bell 1971, Palmer en Rifkind 1974, Liehr e.a. 1975, Bannatyne e.a. 1977). Deze inactivatie kan berusten op veranderingen van endotoxine-structuur door polymyxine B (Lopes en Inniss 1969) en/of binding van polymyxine B aan het lipide A gedeelte van het endotoxine-molecuul (Morrison en Jacobs 1976). Bij leverlijden wordt neomycine frequent gebruikt ter vermindering van het aantal gramnegatieve bacteriën dat ammoniak vormt. Ook polymyxine B is en wordt hiervoor met succes gebruikt (Van der Waay

1980, persoonlijke mededeling). Hoewel van zowel neomycine als polymyxine B geen dramatische vermindering in absorptie uit de darm van endotoxine aangetoond kon worden, is er wel een vermindering in productie in darmlumen van endotoxinen te verwachten. Een vermindering van endotoxinenvorming is door meerdere auteurs voor diverse antibiotica beschreven (Cuevas en Fine 1972, Woodruff e.a. 1973, Dankert e.a. 1979).

Conclusie

1. Bij 20 patiënten zonder leverziekte werden bij 5 (25%) endotoxinen in portaal bloed aangetoond. Bij geen van hen bestond er een systemische endotoxinemie. Van 5 patiënten met levercirrose bestond er bij 3 een portale endotoxinemie.
2. Bij de rat is de endotoxine-absorptie in vivo gering en meestal kleiner dan 0,5 o/oo van de toegediende hoeveelheid endotoxine per 10 cm darm per 2 uur. Er is geen verschil in hoeveelheid endotoxine opgenomen per 10 cm dunne of dikke darm.
3. Bij zowel portale hypertensie als gebruik van 15 g% alcohol als drinkwater is er géén aantoonbare toename in endotoxine-absorptie uit de dunne darm van de rat.
4. De endotoxine-absorptie uit de darm in vivo is bij een ontstoken dikke darm groter dan bij een niet-ontstoken darm.
5. De absorptie van endotoxine bij een omgekeerde darmlus in vitro is significant groter dan bij een (niet-omgekeerde) darmlus in vivo.
6. Cholestyramine geeft geen vermindering van endotoxine-absorptie in vitro.
7. Polymyxine B en neomycine geven een kleine, doch niet significante, vermindering van endotoxine-absorptie in vitro.

9

BESPREKING

In hoofdstuk 1 werden een aantal doelstellingen geformuleerd. In dit hoofdstuk worden de in hoofdstuk 5 t/m 8 beschreven resultaten in het licht van deze doelstellingen geëvalueerd.

De eerste vraagstelling betrof de frequentie van endotoxinemie bij leverziekten. Endotoxinemie tijdens de eerste week van opname werd vastgesteld bij 8 patiënten uit een groep van 22 met acute hepatitis. Bij herstel van de hepatitis verdween de endotoxinemie. Bij de andere 14 patiënten werden nooit endotoxinen gevonden. Twee patiënten van de groep van 22 zijn overleden en beiden hadden een endotoxinemie. Bij de twee overleden patiënten werd de acute hepatitis gecompliceerd door het optreden van acute leverinsufficiëntie, een complicatie met een zeer hoge mortaliteit (Sherlock 1975, Berk en Popper 1978). Door Wilkinson e.a. (1974) werd beschreven dat acute leverinsufficiëntie met endotoxinemie gepaard gaat met een significant hogere mortaliteit dan acute leverinsufficiëntie zonder endotoxinemie. Bij 2 van de 21 poliklinische patiënten met levercirrose en een mesocavale shunt bestond een endotoxinemie. Daarentegen werd bij 20 van de 43 klinische patiënten met levercirrose, een endotoxinemie vastgesteld in de eerste week van opname. Het verschil in mortaliteit tijdens opname tussen de patiënten met (11 van de 20 overleden) en de patiënten zonder endotoxinemie (1 van de 23 overleed) was significant.

Hiermee komen we op de tweede doelstelling van het proefschrift waarin de relatie tussen endotoxinemie en de complicaties en het beloop van leverziekten werd bestudeerd. Bij de patiënten met levercirrose en endotoxinemie bestond significant vaker een nierinsufficiëntie. Het optreden en/of aanwezig zijn van nierinsufficiëntie bij endotoxinemie bij levercirrose wordt eveneens gemeld door andere onderzoekers (Liehr e.a. 1976, Wilkinson e.a. 1976, Clemente e.a. 1977). Het verband tussen endotoxinemie en gestoorde nierfunctie werd ook aangetroffen bij patiënten met acute hepatitis (hoofdstuk 5) en bij patiënten met acute leverinsufficiëntie (Wilkinson e.a. 1974). Het huidige onderzoek laat niet toe een uitspraak te doen over de vraag of er een causaal verband bestaat tussen endotoxinemie en gestoorde nierfunctie.

Patiënten met acute hepatitis of levercirrose met endotoxinemie hadden een significant slechtere stolling, blijktens een lager normotestpercentage, een lager fibrinogeengehalte en een kleiner aantal trombocyten, dan patiënten zonder endotoxinemie. De verlaagde gehalten aan stollingsfactoren zijn te verklaren door een

direct effect van endotoxinen op de stolling, maar ook door een verminderde synthese door de zieke lever. Endotoxinen kunnen aanleiding geven tot trombocytopenie zoals besproken in hoofdstuk 2 en 5. Trombocyten bezitten receptoren voor endotoxinen (Kabir e.a. 1978). Uit ons onderzoek bleek dat het trombocytenaantal evenals het prekallikreïnegehalte lager was tijdens endotoxinemie dan bij afwezigheid van endotoxinemie. De verlaagde plasma-prekallikreïnewaarde bij levercirrose wordt toegeschreven aan een verminderde productie door de lever. Dit vanwege de positieve correlatie van prekallikreïne met andere stollingsfactoren (Stormorken e.a. 1978, Wong 1978). Het lage plasma-prekallikreïnegehalte is echter ook te verklaren door de optredende endotoxinemie bij levercirrose.

Uit de resultaten van de onderzoeken beschreven in de hoofdstukken 5, 6 en 7 blijkt, dat de prognose van patiënten met endotoxinemie slechter is dan van patiënten zonder endotoxinemie. Patiënten met endotoxinemie hebben een hogere mortaliteit. Endotoxinemie blijkt vooral voor te komen bij levercirrose gepaard gaande met encefalopathie (hoofdstuk 6 en 7), varicesbloeding(en), ascites, hoog serumbilirubinegehalte, en de reeds genoemde nierinsufficiëntie. Ook de patiënten met endotoxinemie bij acute hepatitis hadden in het serum hogere bilirubine- en GPT-waarden. Het blijkt dus dat de gebruikelijke parameters voor de beoordeling van "leverfunctie" bij patiënten met endotoxinemie sterker gestoord zijn dan bij patiënten zonder endotoxinemie. Ook uit de onderzoeken van Liehr e.a. (1976), Wilkinson e.a. (1976), Clemente e.a. (1977) en Tarao e.a. (1977) blijkt dat een slechtere leverfunctie gepaard gaat met een hogere frequentie van endotoxinemie. De lever heeft een belangrijke beschermende functie tegen het optreden van endotoxinemie afkomstig uit de darm. Indien endotoxinemie ontstaat dan is het, gezien dierexperimentele gegevens, denkbaar dat ze aanleiding kunnen geven tot verdere beschadiging van de lever (hoofdstuk 2).

De derde doelstelling betrof het nagaan van de frequentie van endotoxinemie bij patiënten met levercirrose en een mesocavale shunt. Daar endotoxinen afkomstig uit de darm door de aanwezigheid van een dergelijke shunt rechtstreeks in de circulatie kunnen komen zou een hoge endotoxinemie-frequentie verwacht kunnen worden. Zoals hierboven werd beschreven was de frequentie laag (2 van de 21). Er waren bij deze poliklinische patiënten in het algemeen geen tekenen wijzend op een slechte leverfunctie. De aanwezigheid van uitingen van een slechte leverfunctie vormde wel de reden tot opname van patiënten met cirrose beschreven in hoofdstuk 7. Het verschil in leverfunctie tussen beide groepen is wellicht de oorzaak van het waargenomen verschil in endotoxinemie-frequentie.

Uit de bestudering van de gegevens van het gammaglobulinegehalte in het serum voor en na de operatie bleek dat het aanleggen van een mesocavale shunt een significante stijging in gammaglobulinegehalte tot gevolg had. Ook bij ratten volgt na het aanleggen van een portosystemische shunt een significante stijging in het gehalte aan gammaglobuline in serum (Keraan e.a. 1974, Benjamin e.a. 1976). Deze verhoging van het gammaglobulinegehalte ontstaat door een toename in antilichaamproductie als reactie op geabsorbeerde bacteriële antigenen (Keraan e.a. 1974,

Benjamin e.a. 1976). Via de aangelegde shunt komen de geabsorbeerde antigenen namelijk rechtstreeks in de circulatie, zonder eerst de lever te passeren; het orgaan dat normaliter de antigenen na absorptie verwijdt uit het bloed. Het is bekend dat antilichamen de fagocytose van het bijbehorend antigeen bevorderen. Het is dan ook heel aantrekkelijk te veronderstellen dat de verhoging aan gammaglobuline in serum bij patiënten met levercirrose een reactie is op bacteriële antigenen, en dat de eliminatie van deze antigenen er door kan worden bevorderd.

De bestudering van de eliminatie van endotoxinen uit bloed vormde de vierde doelstelling van het onderzoek beschreven in dit proefschrift. Het is bekend uit dierproeven (zie hoofdstuk 2) dat het RES, met name van de lever, zorgt voor de verwijdering van endotoxinen uit bloed. Onder experimentele condities is de frequentie van endotoxinemie significant hoger als het RES geblokkeerd is door koolstofpartikels, dan wanneer het RES gestimuleerd is door glucaan. De fagocyterende functie van het RES van de lever is belangrijk bij de opname van antigenen en andere lichaamsvreemde deeltjes uit het bloed (Carr 1977).

De verdwijning van intraveneus toegediend colloïd uit bloed werd in ons onderzoek als maat gebruikt voor de fagocyterende werking van het RES. De RES-functie was bij acute hepatitis-patiënten beter dan bij normalen, en bij cirrose-patiënten slechter dan bij normalen. Een verhoogde colloïdklarende werking van het RES bij acute hepatitis werd eveneens beschreven door Cooksley e.a. (1973) en is te verklaren door een toename in aantal van de Kupffercellen. Ook de activiteit per cel is toegenomen. De RES-functie bij levercirrose vermindert o.a. door een afname van de effectieve bloeddorstrooming van de lever. Ook overmatig alcoholgebruik, dat meestal de oorzaak is van deze cirrose, doet op zich de werking van het RES verminderen (zie hoofdstuk 7, Louria 1963, Liu 1979). Bij metingen van de RES-functie was er geen correlatie tussen de snelheid van colloïdklaring en het al of niet aanwezig zijn van endotoxinemie bij leverziekten.

Het blijkt dus dat de variaties in colloïdklarende functie van het RES bij leverziekten niet van beslissende betekenis zijn voor het al of niet optreden van endotoxinemie.

Antilichamen zijn een belangrijke factor bij de klaring van antigenen, doch niet van colloïd (Stiffel e.a. 1970, Young e.a. 1977, Barrett 1978). Bij patiënten met levercirrose zijn, in vergelijking met gezonde proefpersonen, verhoogde titers aanwezig tegen O-antigenen van darmbacteriën ofwel tegen endotoxinen (Protell e.a. 1971, Björneboe 1971, Björneboe e.a. 1972, Triger e.a. 1972, Prytz e.a. 1973, Simjee e.a. 1975, Prytz e.a. 1977). Antilichamen kunnen de klaring van endotoxinen bevorderen en het is denkbaar dat ze beschermend kunnen werken tegen endotoxinemie (hoofdstuk 6 en 7). Bij patiënten met levercirrose en endotoxinemie (beschreven in hoofdstuk 7) was het gehalte aan gammaglobuline in serum significant lager dan bij patiënten zonder endotoxinemie. Deze bevinding zou dus in bovengenoemde richting kunnen wijzen. Of er bij levercirrose verhoogde titers aan antilichamen bestaan tegen de R-kern en/of tegen het lipide A van endotoxinen zijn (nog) geen publicaties.

Behalve antilichamen kunnen ook andere eiwitten de fagocytose van endotoxinen

bevorderen, zoals b.v. complement (Golub e.a. 1968, Barrett 1978), tuftsine (Spirer e.a. 1977, Barrett 1978), alpha-2-macroglobuline (Van Gool e.a. 1978) en fibronectine (Yamada en Olden 1978, Saba en Jaffe 1980). Aan lysozym wordt ook een fagocytose-stimulerende werking toegeschreven (Klockars en Roberts 1976). De spiegels in plasma van lysozym waren hoger bij patiënten met cirrose dan bij patiënten met een acute hepatitis (hoofdstuk 6). Interessant is nog te vermelden dat Kupffercellen receptoren hebben voor antilichamen en complement (Carr 1977). Heel recent werd aangetoond dat hepatocyten bindingsplaatsen hebben voor endotoxinen (Ramadori e.a. 1979).

De bestudering van factoren die de absorptie van endotoxinen uit de darm beïnvloeden vormde de vijfde en laatste doelstelling van het beschreven onderzoek. Absorptie van endotoxinen uit de darm vindt plaats. Endotoxinen werden aangetoond in bloed afkomstig uit de vena portae of vertakkingen ervan bij 5 van de 20 (25%) onderzochte patiënten zonder leverziekte. Een uitspraak over het aantoonbaar zijn van absorptie van endotoxinen uit de darm was betrouwbaarder geweest, indien het monster steeds uit de vena portae zelf was afgenomen, doch uit praktische overweging was dit niet goed mogelijk. Als de absorptie wisselt in de tijd dan zal dit ook van invloed kunnen zijn op de waargenomen frequentie.

Het toedienen van neomycine per os bleek niet te beschermen tegen het optreden van endotoxinemie bij patiënten met levercirrose (hoofdstuk 7). Het is mogelijk dat vlak na het begin van neomycine-toediening juist een toename plaatsvindt van de endotoxinenproductie in de darm. Het antibioticum polymyxine B maakt tevens endotoxinen onschadelijk (Corrigan en Bell 1971, Palmer en Rifkind 1974) en zou dus te verkiezen zijn boven neomycine. Het is echter ook mogelijk, dat neomycine op grond van zijn beperkt antimicrobieel spectrum onvoldoende afname geeft van alle producten van endotoxinen. Het middel is met name niet werkzaam tegen de gram-negatieve anaërobe flora.

Bij dierproeven bleek dat de absorptie van endotoxinen vanuit de darm *in vivo* gering is, namelijk in 2 uur ongeveer 0,01% van de hoeveelheid endotoxine ingebracht in 10 cm darm. De absorptie van endotoxine *in vitro* bij een 10 cm lange darmlus van de rat bedroeg in 2 uur tijds 0,59%. Een soortgelijke *in vitro* absorptie werd ook door Nolan (1975) en Nolan e.a. (1977) waargenomen. De grotere *in vitro* absorptie is waarschijnlijk te wijten aan een verandering in darmmucosa-barrière voor endotoxine door een veranderde zuurstofvoorziening (Shute 1977, hoofdstuk 8). De absorptie *in vitro* werd niet significant verminderd door cholestyramine, neomycine en ook niet door polymyxine B.

Tot slot nog een korte bespreking van de mogelijkheden tot behandeling van endotoxinemie bij patiënten met leverziekten. De behandeling is onder te verdelen in 3 mogelijkheden, waarvan de laatste twee voornamelijk theoretisch zijn. Ten eerste is het mogelijk de productie van endotoxinen in de darm te verminderen en wel door het terugdringen van het aantal gramnegatieve bacteriën. Neomycine per os lijkt hiervoor niet voldoende effectief. Mogelijk is het gebruik van polymyxine B per os te verkiezen vanwege het endotoxinen-neutraliserend effect van dit

antibioticum. Partiële decontaminatie van de darm zou een andere mogelijkheid kunnen zijn (Van der Waay 1980, persoonlijke mededeling), doch onderzoek hiernaar dient nog verricht te worden. Behalve aan een vermindering van de productie van endotoxinen in de darm kan ook aan de mogelijkheid worden gedacht in de darm aanwezige endotoxinen te verwijderen. Dit zou b.v. kunnen worden bereikt door binding aan cholestyramine (Nolan en Ali 1972, Humphrey e.a. 1979), door laxatie of zelfs door darmlavage (Davis e.a. 1980).

Een tweede mogelijkheid waaraan men denkt is het verwijderen van endotoxinen uit bloed. Hemoperfusie met behulp van hars of koolstof, ter verwijdering van endotoxinen uit bloed werd voorgesteld door Nolan e.a. (1975) doch bleek ineffectief (Wilkinson 1977). Bij intraveneuze toediening van polymyxine B aan patiënten met endotoxinemie werd door Liehr e.a. (1975a) een kortdurend gunstig effect waargenomen. Polymyxine B is echter niet geschikt voor parenteraal gebruik omdat het nogal nefrotoxisch is (Wilkinson 1977).

Een derde mogelijkheid omvat het verhogen van de weerstand tegen endotoxinen. Door vaccinatie met endotoxinen kunnen antilichamen tegen endotoxinen worden opgewekt (Braude e.a. 1977, Pennington 1979, hoofdstuk 2). Hoewel vaccinatie wellicht een beschermend effect heeft tegen endotoxinen, lijkt het vaccineren bij een bestaande endotoxinemie niet zinvol. Theoretisch zou toediening van een antiserum tegen een gemeenschappelijk antigeen van endotoxinen zin kunnen hebben.

SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt een onderzoek beschreven naar het voorkomen van endotoxinemie en de betekenis daarvan bij patiënten met een leverziekte, zoals acute hepatitis en levercirrose.

Endotoxinen, ook wel genaamd lipopolysacchariden, zijn bestanddelen van de celwand van gramnegatieve bacteriën en komen met name vrij bij het doodgaan van deze bacteriën. Endotoxinen zijn opgebouwd uit drie delen, nl.: het lipide A, de R-kern en het O-polysaccharide ofwel het O-antigeen. Het lipide A is het toxische deel van het endotoxine-macromolecuul en de opbouw van het lipide A is voor een groot aantal gramnegatieve bacteriën gelijk. Het O-polysaccharide bepaalt de O-antigene specificiteit van het endotoxine en is verschillend van opbouw bij de diverse bacteriën.

Endotoxinen veroorzaken bij parenterale toediening aan proefdieren een groot aantal effecten zoals koorts, verandering in leuko- en trombocytenaantal, stollingsactivering, complementactivering, nierfunctiestoornissen, leverbeschadiging, hypotensie en shock. Deze effecten zijn in de afgelopen decennia uitgebreid bestudeerd. In *hoofdstuk 2* worden de achtergronden van de genoemde effecten besproken op grond van literatuurgegevens van ongeveer de laatste 10 jaar.

Endotoxinen kunnen vanuit de darm worden geabsorbeerd. De verwijdering van endotoxinen uit het bloed vindt plaats door het reticulo-endotheliale systeem en vooral door de Kupffercellen in de lever. Door een slecht werkend RES of door shunting van het portale bloed om de lever kan endotoxinemie ontstaan.

Leverziekten worden vaak gecompliceerd door het voorkomen van stollingsstoornissen, bloedingen en nierfunctiestoornissen. Endotoxinen kunnen, na absorptie vanuit de darm en onvoldoende verwijdering uit het portale bloed door de lever, identieke afwijkingen doen ontstaan. Het is mogelijk dat de genoemde problemen bij leverziekten door endotoxinen veroorzaakt worden.

De doelstellingen van het onderzoek beschreven in dit proefschrift omvatten dan ook het vaststellen van de frequentie van voorkomen van endotoxinemie bij leverziekten en het bestuderen van de relatie tussen het bestaan van een endotoxinemie en de complicaties bij deze leverziekten. Voorts wordt nagegaan of het bestaan van endotoxinemie bij leverziekten gecorreleerd is met een verminderde activiteit van het reticulo-endotheliale systeem. Ook worden enkele factoren bestudeerd die van invloed zouden kunnen zijn op de absorptie uit de darm van endotoxinen. Deze doelstellingen en de achtergronden ervan worden beschreven in *hoofdstuk 1* en *2*.

In *hoofdstuk 3* wordt een literatuuroverzicht gegeven van de beschikbare methoden voor het aantonen van endotoxinen. Tot voor kort werden hiervoor in vivo methoden gebruikt, met name de konijnenpyrogeentest. Sedert ongeveer tien jaar is er een in vitro methode beschikbaar, die bekend staat als de limulustest. De limulustest berust op het doen ontstaan van stolling (gelvorming) door endotoxinen in een lysaat van bloedcellen van de degenkrab *Limulus polyphemus*. Deze specifieke test is gevoeliger dan de konijntest en sedert kort door de Food and Drug Administration in Amerika goedgekeurd voor het aantonen van endotoxinen in infusievloeistoffen. Voor het aantonen van endotoxinen in bloed is de limulustest ook bruikbaar; wel zijn er dan een aantal maatregelen nodig om de in plasma aanwezige remmers van de gelvorming door endotoxinen te verwijderen. Hierop wordt in het volgende hoofdstuk nader ingegaan.

In *hoofdstuk 4* worden de methoden besproken die gebruikt werden bij het onderzoek beschreven in de hoofdstukken 5 t/m 8. De uitvoering van de limulustest wordt beschreven. Vervolgens wordt ingegaan op het meten van de RES-functie door het bepalen van de verdwijningssnelheid uit bloed van iv toegediend technetium-99m-zwavel-colloïd en door het bepalen van het plasma-lysozymgehalte. De achtergrond en het principe van de bepaling van het plasma-prekallikreïnegehalte wordt eveneens besproken. Voorts wordt de techniek beschreven die gebruikt werd voor het merken van endotoxine met chroom-51. Dit gemerkte endotoxine werd gebruikt bij het onderzoek naar absorptie uit de darm van endotoxinen bij de rat. De gebruikte statistische methoden worden eveneens genoemd.

In *hoofdstuk 5* worden de resultaten vermeld van het onderzoek naar endotoxinemie bij acute hepatitis. Bij 8 patiënten met acute hepatitis van een groep van 22, dit is in 36% van de gevallen, werd een endotoxinemie vastgesteld. Bij deze 8 patiënten met endotoxinemie bestond er, in vergelijking met de patiënten zonder endotoxinemie, in de eerste week van opname vaker een subfebrile temperatuur, was het trombocytenaantal, het fibrinogeengehalte en het normotestpercentage significant lager en was de GPT- en bilirubine-spiegel significant hoger. De endotoxinemie was aanwezig tijdens het hoogtepunt van de hepatitis en verdween bij herstel van de leverafwijking. Bij de patiënten met endotoxinemie was de nierfunctie, te oordelen aan het serum-creatininegehalte, significant verslechterd. In de herstelfase van de hepatitis normaliseerde de nierfunctie zich. Van de 8 patiënten met endotoxinemie zijn er 2 overleden, van de 14 patiënten zonder endotoxinemie herstelden allen.

In *hoofdstuk 6* worden de gegevens vermeld van een na-onderzoek bij patiënten met levercirrose, die wegens een bloeding uit oesofagusvarices een mesocavale shunt-operatie hadden ondergaan. Hoewel shunting als een belangrijke factor beschouwd wordt voor het ontstaan van endotoxinemie, werd er slechts bij 2 (beiden hadden tekenen van encefalopathie) van de 21 patiënten (9,5%) een endotoxinemie aangetoond. Bij de meeste patiënten was de chirurgisch aangelegde shunt zeer waarschijnlijk open. Dit wordt afgeleid uit het feit dat slechts bij 4 van de 21 patiënten nog varices in de oesophagus aangetoond konden worden.

De RES-functie, te oordelen aan de verdwijningssnelheid (halfwaarde-tijd, $T/2$) van

iv toegediend technetium-99m-zwavel-colloïd was bij de patiënten met cirrose en een mesocavale shunt slechter dan bij gezonde proefpersonen en bij patiënten met acute hepatitis. Voorts was de halfwaarde-tijd positief gecorreleerd met het plasmaprothrombinyntimegehalte. Ondanks de aanwezigheid van een mesocavale shunt en een gestoorde RES-functie was de endotoxinemie-frequentie bij deze groep patiënten met cirrose laag.

Bij retrospectief onderzoek van de totale groep van 32 patiënten die in het verleden een mesocavale shunt-operatie hadden ondergaan, bleek dat deze ingreep gevolgd werd door een significante stijging van het serumgammaglobulinegehalte, terwijl het serumalbuminegehalte onveranderd bleef. De verhoging in gammaglobuline was gedurende de gehele periode waarover het onderzoek zich uitstreckte ($\frac{1}{2}$ tot 4 jaar) aanwezig. Deze stijging in gammaglobuline kan, gezien de literatuurgegevens hierover bij proefdieren, een reactie zijn op vanuit de darm geabsorbeerde endotoxinen. Antilichamen bevorderen de inactivatie van endotoxinen en zouden zodoende een lagere endotoxinemie-frequentie tot gevolg kunnen hebben dan theoretisch verwacht zou kunnen worden.

In hoofdstuk 7 worden de resultaten vermeld van het onderzoek bij 43 klinische patiënten met levercirrose. Deze patiënten werden meestal opgenomen wegens één of meer problemen bij levercirrose, zoals encefalopathie, ascites of bloeding uit de tractus digestivus, en waren dus in een slechtere conditie dan de poliklinische patiënten die beschreven zijn in hoofdstuk 6. Bij 20 patiënten van de groep van 43 (46,5%) werd een endotoxinemie vastgesteld. De patiënten met endotoxinemie hadden in vergelijking met de patiënten zonder endotoxinemie een significant lager trombocytenaantal, lager gammaglobuline- en fibrinogeengehalte en een lager normotestpercentage. Voorts was het trombocytenaantal bij de patiënten die intermitterend endotoxinemie hadden, significant lager tijdens een endotoxinemie-periode dan daarbuiten. Endotoxinemie kwam vooral voor bij patiënten die verschijnselen hadden van een slechte leverfunctie, zoals encefalopathie, stollingsstoornissen, verhoogd bilirubinegehalte, ascites en nierinsufficiëntie. Het gebruik van neomycine bleek niet te beschermen tegen het optreden van endotoxinemie.

Tijdens opname was de mortaliteit bij de patiënten met endotoxinemie 55%, en bij de patiënten zonder endotoxinemie 4%. Dit verschil is significant. Bij de endotoxinenpositieve patiënten die tijdens opname herstelden, verdween de endotoxinemie. Dit was niet het geval bij de endotoxinenpositieve patiënten die tijdens opname overleden. De patiënten van deze laatste groep hadden bovendien een progressieve nierinsufficiëntie en een significant hoger bilirubinegehalte.

Bij de patiënten met levercirrose was het plasma-prekalikreïnegehalte significant lager dan bij gezonde personen. Voorts was het prekallikreïnegehalte significant lager bij de patiënten met endotoxinemie dan bij de patiënten zonder endotoxinemie. Tijdens een endotoxinemieperiode was het prekallikreïnegehalte lager dan daarbuiten. Tevens bleek de in vitro activatie van prekallikreïne in plasma van patiënten met levercirrose vertraagd.

De RES-functie was bij de endotoxinenpositieve patiënten niet slechter dan bij de

endotoxinennegatieve patiënten. Wel was de RES-functie bij patiënten met een alcoholische levercirrose slechter dan bij patiënten met een niet-alcoholische levercirrose. Voorts was het gammaglobulinegehalte bij de patiënten met endotoxinemie lager dan bij de patiënten zonder endotoxinemie. Dit is in overeenstemming met de in hoofdstuk 6 geformuleerde hypothese, waarbij aan een hoog gammaglobulinegehalte in serum een beschermende werking tegen endotoxinemie wordt toegeschreven.

In ascites bij patiënten met levercirrose werden slechts in 12% der gevallen endotoxinen aangetoond. Dit percentage kwam sterk overeen met het percentage waarin endotoxinen in bloed (16%) aangetoond werden bij deze patiënten. De aanwezigheid van endotoxinen in ascites ging niet gepaard met een hoog totaal eiwitgehalte in ascites.

In *hoofdstuk 8* worden de resultaten vermeld van het onderzoek naar de absorptie uit de darm van endotoxinen. Bij 5 patiënten zonder leverziekte van een groep van 20 (25%) werden endotoxinen in portaal bloed aangetoond. Bij geen van hen bestond er een systemische endotoxinemie. Bij 3 patiënten met levercirrose van een groep van 5, werden in portaal bloed endotoxinen aangetoond.

De absorptie uit een afgebonden darmsegment van radio-actief gemerkt endotoxine bereid uit *E. coli* werd nagegaan bij ratten. De absorptie in vivo was gering en meestal kleiner dan 0,5 o/oo van de toegediende 2 mg endotoxine per 10 cm darm in 2 uur. Er bestond geen verschil in hoeveelheid endotoxine opgenomen per gelijke lengte dunne of dikke darm. Na het opwekken van portale hypertensie of na gebruik van alcoholhoudend drinkwater (15 g%) ontstond er geen aantoonbare toename in endotoxine-absorptie uit de darm van de rat. Na het opwekken van een colitis was er echter wel een grotere endotoxine-absorptie.

De absorptie van endotoxine bij een omgekeerde darmlus in vitro was significant groter dan bij een niet-omgekeerde darmlus in vivo.

Polymyxine B en neomycine gaven een kleine, doch niet significante vermindering van endotoxine-absorptie in vitro.

In *hoofdstuk 9* worden de in het begin van het proefschrift genoemde doelstellingen geëvalueerd in het licht van de gegevens van het onderzoek beschreven in de hoofdstukken 5 t/m 8. Tevens worden de mogelijkheden tot de behandeling van endotoxinemie besproken.

SUMMARY

This thesis is concerned with an investigation into the incidence and clinical importance of endotoxemia in liver disease as acute hepatitis and liver cirrhosis. Endotoxins are lipopolysaccharides which form part of the cell wall of gramnegative bacteria.

Endotoxins are mainly released after death of the bacteria. The lipopolysaccharides consist of three parts - the lipid A portion, the R-core and the O-polysaccharide or O-antigen. Lipid A is the part of the endotoxin macromolecule which is responsible for most of the toxic effects of endotoxins, and is almost identical for a large number of gramnegative bacteria. The O-polysaccharide determines the O-antigen specificity of the endotoxin and varies between different bacteria. Parenteral administration of endotoxins to experimental animals gives rise to a number of effects such as fever, changes in peripheral white blood cell count and platelet count, activation of the clotting mechanism and the complement pathway, renal function changes, liver damage, hypotension and shock. These effects have been extensively studied during the past decades. The review of endotoxin effects in chapter 2 of this thesis is mainly derived from a literature survey covering the past 10 years.

Endotoxins may be absorbed from the bowel. Endotoxins are removed from the portal blood by the reticuloendothelial system, (RES), mainly by the Kupffer cells in the liver. Systemic endotoxemia can result from poor functioning of the reticuloendothelial system or from shunting of portal blood round the liver. Human liver disease is associated with complications such as disorders of the clotting mechanism, hemorrhage and renal failure. It is possible that these changes are due to endotoxins which have been absorbed from the intestines, but which have not been cleared by the liver.

The aims of the investigation described in this thesis were to determine the incidence of endotoxemia in various types of liver disease and to see whether endotoxemia was associated with the complications of the liver disease. In addition a study was performed to determine whether the occurrence of endotoxemia in hepatic disease could be correlated with a decreased activity of the reticuloendothelial system. Some factors of possible influence on the absorption of endotoxins from the intestines were also studied.

The available methods for demonstrating the presence of endotoxins are reviewed in chapter 3. Until recently in vivo methods were mainly used, of which the pyrogen

test in rabbits was the most popular. Ten years ago an in vitro technique became available, the so-called limulus test. This test is based on the observation that endotoxins induce clotting or gel formation in a lysate of the horse-shoe crab, the *Limulus polyphemus*. This test is more sensitive than the rabbit pyrogen technique and has recently been approved by the USA Food and Drug Administration for the detection of endotoxins and pyrogens in infusion fluids. The limulus test is also applicable to the detection of endotoxins in blood, but care has to be taken to remove inactivators of the gel formation which are present in plasma.

The methods which were used during this investigation are described in chapter 4. The limulus test is described in detail. The measurement of reticuloendothelial function by means of determining the plasma disappearance rate of technetium (^{99m}Tc)-sulphur colloid is reported, as well as the determination of the plasma lysozyme activity. The principle and method used to determine plasma prekallikrein content are also discussed. The labeling of endotoxins with ^{51}Cr (chromium) for use in the absorption studies is described. A brief description of the statistical methods used to evaluate the results is also included in this chapter.

In chapter 5 the results are described of an investigation of endotoxemia in patients with acute hepatitis. Endotoxemia was found in 8 out of 22 patients with acute hepatitis (36%). Patients with endotoxemia during the first week of admission had a higher incidence of low-grade fever and had a significantly lower platelet count, fibrinogen level and Normotest percentage, and a significantly higher GPT and bilirubin level than patients without endotoxemia. The endotoxemia was present during the height of the disease and disappeared during the recovery phase of the hepatitis. Patients with endotoxemia had a significantly poorer renal function as measured by the serum creatinine level. The renal function disturbance was temporary. Two of the 8 patients with endotoxemia died, all 14 patients without endotoxemia recovered.

A follow-up study of patients with hepatic cirrhosis who had undergone a mesocaval shunt operation for bleeding esophageal varices is presented in chapter 6. Although shunting is considered to be an important factor in the development of endotoxemia, only 2 of 21 patients had endotoxemia (9.5%). Both patients had hepatic encephalopathy. The surgical shunt seemed still functioning in most of these 21 patients as varices could only be demonstrated in 4 patients at this follow-up examination.

The reticuloendothelial function was significantly poorer in these patients than in healthy controls or in patients with acute hepatitis. The ^{99m}Tc -colloid half-time showed a positive correlation with the plasma lysozyme level, an unexpected finding as in animal experiments poor RES function is associated with low lysozyme levels. Thus despite the presence of a mesocaval shunt and a poorer RES function, the frequency of endotoxemia in this group of patients was low.

A retrospective analysis of 32 patients who had undergone a mesocaval graft interposition in the past was then undertaken. Following the operation the levels of gamma globulin rose significantly, while the serum albumin levels remained

unchanged. The raised gamma globulin levels were present for up to four years. This rise in gamma globulin is in the light of data from animal experiments probably due to endotoxins derived from the gut, which provoke an antibody response if these antigens are not cleared by the RES of the liver. Antibodies facilitate the removal of the endotoxins and could thus be the explanation for the surprisingly low incidence of endotoxemia in these patients.

In chapter 7 the results are described of an investigation of 43 hospitalized patients with cirrhosis of the liver. Most of these patients had been admitted because of one or more of the complications of liver cirrhosis such as encephalopathy, ascites or hemorrhage from the gastrointestinal tract, and were thus in poorer condition than the out-patients discussed in chapter 6. Endotoxemia was found in 20 of the 43 patients (46.5%). In comparison with the patients without endotoxemia, patients with endotoxemia had a significantly lower platelet count, gamma globulin level, fibrinogen level and Normotest percentage. In patients with intermittent endotoxemia, the platelet count was lower during the period of endotoxemia than during the period without. Endotoxemia occurred in patients with manifestations usually regarded as representing decreased hepatic function, such as encephalopathy, clotting disorders, jaundice, ascites and renal failure. The use of neomycin did not appear to protect against endotoxemia.

During admission the mortality in the group of patients with endotoxemia was 55%, in the group without endotoxemia 4%. This difference is significant. In patients with endotoxemia the endotoxemia disappeared in patients who recovered, as opposed to in those patients who died. A fatal course was associated with progressive renal insufficiency, and a significantly higher bilirubin level.

The prekallikrein level was low in patients with liver cirrhosis, and was correlated with the Normotest. The prekallikrein level was lower in patients with endotoxemia than in patients without, and in individual patients the prekallikrein level was lower during the period of endotoxemia than in the non-endotoxemic periods. In addition activation of prekallikrein *in vitro* was delayed in the patients with cirrhosis.

The RES function was similar in endotoxin positive and endotoxin negative patients. Patients with alcoholic cirrhosis had a poorer RES function than patients with non-alcoholic hepatic cirrhosis. The gamma globulin level was lower in the patients with endotoxemia than in the patients without endotoxemia, which is in agreement with the findings reported in chapter 6, and compatible with the concept that a raised gamma globulin level exerts a protective effect against endotoxemia.

In a group of patients with liver cirrhosis and ascites endotoxins were only demonstrated in ascites in 12% of these patients. These findings were similar with the incidence of endotoxemia in blood of these patients (16%). The presence of endotoxins in ascites was not associated with a different protein content of the ascites.

A study of endotoxin absorption from the intestines is described in chapter 8. Portal blood was obtained at laparotomy from 20 patients without liver disease. In 5 (25%) endotoxins were found in the portal blood. Systemic endotoxemia was not

encountered. Endotoxins were found in portal blood in 3 out of 5 patients with cirrhosis.

The absorption of radio-labeled *E. coli* endotoxin was studied in the rat by means of ligated gut segments. Absorption in vivo was low, mostly less than 0.05% of the administered dose of 2 mg per 10 cm intestine per 2 hours. The amount absorbed from the small intestine did not differ from that absorbed from the large intestine. Portal hypertension (partial ligation of the portal vein) or the administration of alcohol in the drinking water (15 g/100 ml) was not followed by a demonstrable increase in endotoxin absorption. The production of colitis by means of rectal administration of dilute acetic acid was associated with an increased endotoxin absorption.

Absorption of endotoxin from an everted gut sac, a method which has been used to study the kinetics of endotoxin absorption, was significantly greater than from the intestine in vivo. Polymyxin B and neomycin produced a slight, nonsignificant decrease in endotoxin absorption in vitro.

In chapter 9 the results of the studies described in this thesis are evaluated in the light of the aims set out in chapter 1. A short comment concerning possible methods of treating endotoxemia is given.

LITERATUURLIJST

- ALI MV en NOLAN JP. Alcohol induced depression of reticuloendothelial function in the rat. *J Lab Clin Med* 1967; 70 : 295-301.
- VAN ALPHEN L. Architecture of the outer membrane of *Escherichia coli*: protein-lipo-polysaccharide interactions. Utrecht: proefschrift, 1979.
- ANSLEY JD, BETHEL RA, BOWEN PA en WARREN WD. Effect of peritoneovenous shunting with the LeVeen valve on ascites, renal function, and coagulation in six patients with intractable ascites. *Surgery* 1978; 83 : 181-187.
- AOKI K. A study of endotoxemia in ulcerative colitis and Crohn's disease. I. Clinical study. *Acta Med Okayama* 1978; 32 : 147-158.
- VAN ASPEREN DE BOER FRs. Combined adrenergic blockade in canine endotoxin shock. An experimental study. Rotterdam: proefschrift, 1977.
- BAILEY ME. Endotoxin, bile salts and renal function in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1976; 63 : 774-778.
- BAKER PJ en WILSON JB. Hypoferremia in mice and its application to the bioassay of endotoxin. *J Bacteriol* 1965; 90 : 903-910.
- BALIS JU, RAPPAPORT ES, GERBER L, FAREED J, BUDDINGH F en MESSMORE HL. A primate model for prolonged endotoxin shock. Blood-vascular reactions and effects of glucocorticoid treatment. *Lab Invest* 1978; 38 : 511-523.
- BANG FB. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1956; 98 : 325-351.
- BANNATYNE RM, HARNETT NM, LEE K-Y en BIGGAR WD. Inhibition of the biologic effects of endotoxin on neutrophils by polymyxin B sulfate. *J Infect Dis* 1977; 136 : 469-474.
- BAR-MEIR S, LERNER E en CONN HO. Analysis of ascitic fluid in cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1979; 24 : 136-144.
- BARRETT JT. Phagocytosis. In: *Textbook of immunology*, 3rd ed. Saint Louis: Mosby Company, 1978 : 261-279.
- BAUD L, SRAER J, SRAER J-D en ARDAILLOU R. Effect of *Escherichia coli* lipo-polysaccharide on renal glomerular and tubular adenylate cyclase. *Nephron* 1977; 19 : 342-349.
- BENJAMIN IS, RYAN CJ, McLAY ALC, HORNECHW en BLUMGART LH. The effects of portacaval shunting and portacaval transposition on serum IgG levels in the rat. *Gastroenterology* 1976; 70 : 661-664.
- VAN DEN BERG JWO, VAN BLANKENSTEIN M, BOSMAN-JACOBS EP, FRENKEL M, HÖRCHNER P, OOST-HARWIG OI en WILSON JHP. Solid phase radio-immunoassay for determination of conjugated cholic acid in serum. *Clin Chim Acta* 1976; 73 : 277-283.

- BERGER SR, HELMS RA en BULL DM. Cirrhotic hyperglobulinemia. Increased rates of immunoglobulin synthesis by circulating lymphoid cells. *Dig Dis Sci* 1979; 24 : 741-745.
- BERGHUIS PHE. Een scintigrafisch onderzoek van morfologie en functie van de lever. Rotterdam: proefschrift, 1976.
- BERK PD en POPPER H. Fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* 1978; 69 : 349-400.
- BERNHEIM HA, BLOCK LH en ATKINS E. Fever: pathogenesis, pathophysiology, and purpose. *Ann Intern Med* 1979; 91 : 261-270.
- BJÖRNEBOE M. Anti-salmonella agglutinins in chronic active liver disease. *Lancet* 1971; 2 : 484-485.
- BJÖRNEBOE M, PRYTZ H en ÖRSKOV F. Antibodies to intestinal microbes in serum of patients with cirrhosis of the liver. *Lancet* 1972; 1 : 58-60.
- BLASCHKE TF, ELIN RJ, BERK PD, SONG CS en WOLFF SM. Effect of induced fever on sulfobromophthalein kinetics in man. *Ann Intern Med* 1973; 78 : 221-226.
- BOIVIN A, MESROBEANU I en MESROBEANU L. Technique pour la préparation des polysaccharides microbiens spécifiques. *Soc Biol* 1933; 113 : 490-492.
- BOUMA JMW. Endocytosis of circulating enzymes by sinusoidal liver cells. *Kupffer Cell Bulletin* 1979; 2 : 13-20.
- BOYER TB, KAHN AM en REYNOLDS TB. Diagnostic value of ascitic fluid lactic dehydrogenase, protein, and WBC levels. *Arch Intern Med* 1978; 138 : 1103-1105.
- BRADFIELD JWB. Control of spillover. The importance of Kupffer-cell function in clinical medicine. *Lancet* 1974; 2 : 883-886.
- BRAUDE AI. Absorption, distribution and elimination of endotoxins and their derivatives. In: Landy M en Braun W eds. *Bacterial endotoxins*. New Brunswick: Rutgers University Press, 1964: 98-109.
- BRAUDE AI, CAREY FJ, SUTHERLAND D en ZALESKY M. Studies with radioactive endotoxin. I. The use of Cr⁵¹ to label endotoxin of *Escherichia coli*. *J Clin Invest* 1955; 34 : 850-857.
- BRAUDE AI, ZIEGLIER EJ, DOUGLAS H en McCUTHAN JA. Antibody to cell wall glycolipid of gram-negative bacteria: induction of immunity to bacteremia and endotoxemia. *J Infect Dis* 1977; S 136 : S 167-S173.
- BRUCER M. Liver scans, clearances, and perfusions. The development of nuclear hepatology. New York: Krieger, 1977: 1-155.
- BUCHANAN BJ en FILKINS JP. Insulin secretion and the carbohydrate metabolic alterations of endotoxemia. *Circ Shock* 1976; 3 : 267-280.
- CAMERON JL, ZUIDEMA GD, SMITH GW, HARRINGTON DP en MADDREY WC. Mesocaval shunts for the control of bleeding esophageal varices. *Surgery* 1979; 85 : 257-262.
- CARIDIS DT, ISHIYAMA M, WOODRUFF PWH en FINE J. Role of the intestinal flora in clearance and detoxification of circulating endotoxin. *J Reticuloendothel Soc* 1973; 14 : 513-521.
- CARIDIS DT, REINHOLD RB, WOODRUFF PWH en FINE J. Endotoxaemia in man. *Lancet* 1972; 1 : 1381-1386.

- CARR I. The Kupffer cell- an overview. In: Wisse E en Knook DL eds. Kupffer cells and other liver sinusoidal cells. Amsterdam: Elsevier/North-Holland. Biomedical Press, 1977 : 355-364.
- CASTELL DO en JOHNSON RB. The ^{198}Au liver scan. An index of portal-systemic collateral circulation in chronic liver disease. *N Engl J Med* 1966; 275 : 188-192.
- CAVANAGH D, CLARK PJ en McLEOD AGW. Septic shock of endotoxin type. Some observations based on the management of 50 patients. *Am J Obstet Gynecol* 1968; 102 : 13-20.
- CAVANAGH D, RAO PS, SUTTON DMC, BHAGAT BD en BACHMANN F. Pathophysiology of endotoxin shock in the primate. *Am J Obstet Gynecol* 1970; 108 : 705-722.
- CHAN JYC, HABAL FM, BURROWES CE en MOVAT HZ. Interaction between factor XII (Hageman factor), high molecular weight kininogen and prekallikrein. *Thromb Res* 1976; 9 : 423-433.
- CLARK SE, SCULLY MF, WEBB P en KAKKAR VV. Measurement of endotoxin levels in plasma using *Limulus* amoebocyte lysate and chromogenic substrate, S 2222. *Thromb Haemost* 1979; 42 : 110.
- CLEMENTE C, BOSCH J, RODÉS J, ARROYO V, MAS A en MARAGALL S. Functional renal failure and haemorrhagic gastritis associated with endotoxaemia in cirrhosis. *Gut* 1977; 18 : 556-560.
- COATES DA. Enhancement of the sensitivity of the *Limulus* assay for the detection of Gram negative bacteria. *J Appl Bacteriol* 1977; 42 : 445-449.
- COBLENTZ A, KELLY KH, FITZPATRICK L en BIERMAN HR. Microbiologic studies of the portal and hepatic venous blood in man. *Am J Med Sci* 1954; 228 : 298-300.
- COCHRANE CG en GRIFFIN JH. Molecular assembly in the contact phase of the Hageman factor system. *Am J Med* 1979; 67 : 657-664.
- COHEN JA en KAPLAN MM. The SGOT/SGPT ratio- an indicator of alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 1979; 24 : 835-838.
- COLIN R, GRANCHER T, LEMELAND J-F, HECKETSWEILER P, GALMICHE J-P, LE GRIX A en GEFFROY Y. Recherche d'une endotoxémie dans les entéro-colites inflammatoires cryptogénétiques. *Gastroenterol Clin Biol* 1979; 3 : 15-19.
- CONN HO. Trailmaking and number-connecting tests in the assessment of mental state in portal systemic encephalopathy. *Am J Dig Dis* 1977; 22 : 541-550.
- CONN HO en FESSEL JM. Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: variations on a theme. *Medicine* 1971; 50 : 161-197.
- COOKSLEY WGE, POWELL LW en HALLIDAY JW. Reticuloendothelial phagocytic function in human liver disease and its relationship to haemolysis. *Br J Haematol* 1973; 25 : 147-164.
- COOPER JF. Principles and applications of the *Limulus* test for pyrogen in parenteral drugs. *Bull Parent Drug Assoc* 1975; 29 : 122-130.
- COOPER JF en HERBERT JC. Endotoxin as a cause of aseptic meningitis after radio-nuclide cisternography. *J Nucl Med* 1975; 16 : 809-813.
- COOPER JF, HOCHSTEIN HD en SELIGMANN EB. The *Limulus* test for endotoxin (pyrogen) in radiopharmaceuticals and biologicals. *Bull Parent Drug Assoc* 1972; 26 : 153-162.

- COOPER JF, LEVIN J en WAGNER HN. Quantitative comparison of in vitro and in vivo methods for the detection of endotoxin. *J Lab Clin Med* 1971; 78 : 138-148.
- COOPERSTOCK MS, TUCKER RP en BAUBLIS JV. Possible pathogenic role of endotoxin in Reye's syndrome. *Lancet* 1975; 1 : 1272-1274.
- CORNELL R, WALKER A en ISSELBACHER KJ. Small intestinal absorption of horseradish peroxidase. A cytochemical study. *Lab Invest* 1971; 25 : 42-48.
- CORRIGAN JJ en BELL BM. Endotoxin-induced intravascular coagulation; prevention with polymyxin B sulfate. *J Lab Clin Med* 1971; 77 : 802-810.
- CUEVAS P en FINE J. Role of intra-intestinal endotoxin in death from peritonitis. *Surg Gynecol Obstet* 1972; 134 : 953-957.
- DANIELE R, SINGH H, APPERT HE, PAIRENT FW en HOWARD JM. Lymphatic absorption of intraperitoneal endotoxin in the dog. *Surgery* 1970; 67 : 484-487.
- DANKERT J, DE VRIES JA en VENINGA TS. Intestinal endotoxin and the occurrence of unexplained fever in leukaemic patients during treatment with cyclophosphamide. In: Fliedner T, Heit H, Niethammer D en Pflieger H eds. *Clin and Experim Gnotobiotics. Zentralbl Bakteriell* 1979; Suppl 7 : 369-376.
- DAOUST DR, ORLOWSKI SJ, McMAHON G, WEBER CK, SHAW WC, FISHER TC, BENNETT CR en GRAY A. Limulus amebocyte lysate test as a method for detection of endotoxins and endotoxin-like materials. *Bull Parent Drug Assoc* 1976; 30 : 13-20.
- DAS J, SCHWARTZ AA en FOLKMAN J. Clearance of endotoxin by platelets: role in increasing the accuracy of the Limulus gelation test and in combating experimental endotoxemia. *Surgery* 1973; 74 : 235-240.
- DAVIS GR, SANTA ANA CA, MORAWSKI SG en FORDTRAN JS. Development of a lavage solution associated with minimal water and electrolyte absorption or secretion. *Gastroenterology* 1980; 78 : 991-995.
- DE NARDO SJ, BELL GB, DENARDO GL, CARETTA RF, SCHEIBE PO, IMPERATO TJ en JACKSON PE. Diagnosis of cirrhosis and hepatitis by quantitative hepatic and other reticuloendothelial clearance rates. *J Nucl Med* 1976; 17 : 449-459.
- DENCKER H, KAMME C, NORRYD C, MÅRDH P-A en TYLÉN U. Examination for aerobic and anaerobic bacteria in human portal blood collected by transumbilical catheterization. *Scand J Gastroenterol* 1974; 9 : 367-369.
- DIETZMAN RH, BECKMAN CB, ROMERO LH, SCHULTZ LS en LILLEHEI RC. Effects of blunted sympathetic nervous system response on regional tissue perfusion in experimental endotoxic shock. *J Surg Res* 1973; 14 : 412-419.
- DINARELLO CA, BODEL PT en ATKINS E. The role of the liver in the production of fever and in pyrogenic tolerance. *Trans Assoc Am Physicians* 1968; 81 : 334-344.
- DINARELLO CA en WOLFF SM. Pathogenesis of fever. *N Engl J Med* 1978; 298 : 607-612.
- DOWLING JB. Ten years' experience with mesocaval grafts. *Surg Gynecol Obstet* 1979; 149 : 518-522.
- DUBOIS M, GILLES KA, HAMILTON JK, REBERS PA en SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956; 28 : 350-356.

- ELIN RJ, ROBINSON RA, LEVINE AS en WOLFF SM. Lack of clinical usefulness of the limulus test in the diagnosis of endotoxemia. *N Engl J Med* 1975; 293 : 521-524.
- ELIN RJ, SANDBERG AL en ROSENSTREICH DL. Comparison of the pyrogenicity, limulus activity, mitogenicity and complement reactivity of several bacterial endotoxins and related compounds. *J Immunol* 1976; 117 : 1238-1242.
- ELIN RJ en WOLFF SM. Nonspecificity of the Limulus amebocyte lysate test; positive reactions with polynucleotides and proteins. *J Infect Dis* 1973; 128 : 349-352.
- ELIN RJ en WOLFF SM. Biology of endotoxin. *Annu Rev Med* 1976; 27 : 127-141.
- EPSTEIN M, BERK DP, HOLLENBERG NK, ADAMS DF, CHALMERS TC, ABRAMS HL en MERRILL JP. Renal failure in the patient with cirrhosis. *Am J Med* 1970; 49 : 175-185.
- FARRAR WE en CORWIN LM. The essential role of the liver in detoxification of endotoxin. *Ann N Y Acad Sci* 1966; 133 : 668-684.
- FELDMAN S en PEARSON TA. The Limulus test and Gram-negative bacillary sepsis. *Am J Dis Child* 1974; 128 : 172-174.
- FILKINS JP. Bioassay of endotoxin inactivation in the lead-sensitized rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970; 134 : 610-612.
- FILKINS JP. Hepatic lysosomes and the inactivation of endotoxin. *J Reticuloendothel Soc* 1971; 9 : 480-490.
- FILKINS JP en YELICH MR. RES function and glucoregulation in endotoxemia. In: Liehr H and Grün M eds. *The reticuloendothelial system and the pathogenesis of liver disease*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980 : 89-98.
- FLOWERS DJ. A micro technique for endotoxin assay by using Limulus lysate. *Med Lab Sci* 1979; 36 : 171-176.
- FOSSARD DP, KAKKAR VV en ELSEY PA. Assessment of Limulus test for detecting endotoxaemia. *Br Med J* 1974; 2 : 465-468.
- FOX JE, McELLIGOTT TF en BECK IT. Effect of ethanol on the morphology of hamster jejunum. *Am J Dig Dis* 1978; 23 : 201-209.
- FREUDENBERG MA en GALANOS C. Interaction of lipopolysaccharides and lipid A with complement in rats and its relation to endotoxicity. *Infect Immun* 1978; 19 : 875-882.
- FRIBERGER P, ERIKSSON E, GUSTAVSSON S en CLAESON G. Determination of prekallikrein in plasma by means of a chromogenic tripeptide substrate for plasma prekallikrein. *Adv Exp Med Biol* 1979; 120 A : 67-82.
- FUJII M, YASUNAGA K en UCHINO H. Correlation analysis of relationships between vitamin-K-dependent clotting factors and effective hepatic blood flow, albumin and other liver function tests. *Haemostasis* 1980; 9 : 9-14.
- FULENWIDER JT, SIBLEY C, STEIN SF, EVATT B, NORDLINGER BM en IVEY GL. Endotoxemia of cirrhosis: an observation not substantiated. *Gastroenterology* 1980; 78 : 1001-1004.
- VAN FURTH R, CROFTON RW en DIESSELHOFF-DEN DULK MMC. The bone marrow origin of Kupffer cells. In: Wisse E en Knook DL eds. *Kupffer cells and other liver sinusoidal cells*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1977 : 471-480.

- GALAMBOS JT. Pathophysiology: Digestion and absorption in cirrhosis. In: Cirrhosis. Philadelphia: Saunders Company, 1979a: 131-134.
- GALAMBOS JT. Evaluation and therapy of ascites. In: Cirrhosis. Philadelphia: Saunders Company, 1979b: 323-356.
- GALAMBOS JT. Prognosis of cirrhosis. In: Cirrhosis. Philadelphia: Saunders Company, 1979c: 357-362.
- GALANOS C. Physical state and biological activity of lipopolysaccharides. Toxicity and immunogenicity of the lipid A component. *Z Immunitätsforsch Immunobiol* 1975; 149 : 214-229.
- GALANOS C en LÜDERITZ O. Electrodialysis of lipopolysaccharides and their conversion to uniform salt forms. *Eur J Biochem* 1975; 54 : 603-610.
- GALANOS C en LÜDERITZ O. The role of the physical state of lipopolysaccharides in the interaction with complement. High molecular weight as prerequisite for the expression of anti-complementary activity. *Eur J Biochem* 1976; 65 : 403-408.
- GALANOS C, LUDERITZ O en WESTPHAL O. Preparation and properties of antisera against the lipid-A component of bacterial lipopolysaccharides. *Eur J Biochem* 1971; 24: 116-122.
- GALANOS C, LÜDERITZ O en WESTPHAL O. Preparation and properties of a standardized lipopolysaccharide from *Salmonella abortus equi* (Novo-Pyrexal). *Zentralbl Bakteriol (Orig A)* 1979; 243 : 226-244.
- GALANOS C, RIETSCHEL ET, LÜDERITZ O, WESTPHAL O, KIM YB en WATSON DW. Biological activities of lipid A complexed with bovine-serum albumin. *Eur J Biochem* 1972; 31 : 230-233.
- GANS H en MATSUMOTO K. The escape of endotoxin from the intestine. *Surg Gynecol Obstet* 1974; 139 : 395-402.
- GATES GA, HENLEY KS, POLLARD HM, SCHMIDT E en SCHMIDT FW. The cell population of human liver. *J Lab Clin Med* 1961; 57 : 182-184.
- GAZZARD BG, HENDERSON JM en WILLIAMS R. Factor VII levels as a guide to prognosis in fulminant hepatic failure. *Gut* 1976; 17 : 489-491.
- GENTILINI P, LAFFI G, BUZZELLI G, STEFANI P, SCARPELLI P, PALADINI S, SMORLESI C, LA VILLA G en FORTI G. Functional renal alterations in chronic liver diseases. *Digestion* 1980; 20 : 73-78.
- GILLES FH, AVERILL DR en KERR C. Endotoxin encephalopathy. *Trans Am Neurol Assoc* 1976; 101 : 91-93.
- GIPS CH. Alcohol, diseases of alcoholics and alcoholic liver disease. *Neth J Med* 1978; 21 : 83-90.
- GOLUB S, GRÖSCHEL D en NOWOTNY A. Factors which affect the reticuloendothelial system uptake of bacterial endotoxins. *J Reticuloendothel Soc* 1968; 5 : 324-339.
- GOODMAN GW en SULTZER BM. Endotoxin protein is a mitogen and polyclonal activator of human B lymphocytes. *J Exp Med* 1979; 149 : 713-723.
- GOODMAN ML, WAY BA en IRWIN JW. The inflammatory response to endotoxin. *J Pathol* 1979; 128 : 7-14.
- VAN GOOL J, BOERS W en DE NIE I. Inhibitory effects of rat α_2 macrofetoprotein (α_m FP), an acute phase globulin, on galactosamine hepatitis. *Exp Mol Pathol* 1978; 29 : 228-240.

- GORBACH SL, LAL D en LEVITAN R. Intestinal microflora in Laennec's cirrhosis. *J Clin Invest* 1970; 49 : 36a.
- GREENE R, WIZNITZER T, RUTENBERG S, FRANK E en FINE J. Hepatic clearance of endotoxin absorbed from the intestine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961; 108 : 261-263.
- GREISMAN SE en HORNICK RB. Comparative pyrogenic reactivity of rabbit and man to bacterial endotoxin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969; 131 : 1154-1158.
- GREISMAN SE en HORNICK RB. Mechanisms of endotoxin tolerance with special reference to man. *J Infect Dis* 1973; S128 : S265-S276.
- GREISMAN SE en WOODWARD CL. Mechanisms of endotoxin tolerance. VII The role of the liver. *J Immunol* 1970; 105 : 1468-1476.
- GROSZMANN RJ, KRAVETZ D en PARYSOW O. Intrahepatic arteriovenous shunting in cirrhosis of the liver. *Gastroenterology* 1977; 73 : 201-204.
- GRÜN M en LIEHR H. Biological significance of altered Von Kupffer cell function in experimental liver disease. In: Wisse E en Knook DL, eds. *Kupffer cells and other liver sinusoidal cells*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1977 : 437-446.
- GRÜN M, LIEHR H en RASENACK U. Significance of endotoxaemia in experimental "galactosamine-hepatitis" in the rat. *Acta Hepatogastroenterol* 1976; 23 : 64-81.
- GRÜN M, LIEHR H, GRÜN W, RASENACK U en BRUNSWIG D. Influence of liver-RES on toxic liver damage due to galactosamine. *Acta Hepatogastroenterol* 1974; 21 : 5-15.
- HANSEN NE, KARLE H, ANDERSEN V en ÖLGAARD K. Lysozyme turnover in man. *J Clin Invest* 1972; 51 : 1146-1155.
- HARADA T, OHKI M, NIWA M en IWANAGAS. A new fluorogenic substrate method for assay of bacterial endotoxins using *Lumulus* hemocyte lysate. *Thromb Haemost* 1979; 42 : 109.
- HARRIS NS en FEINSTEIN R. A new limulus assay for the detection of endotoxin. *J Trauma* 1977; 17 : 714-718.
- HAWIGER J, HAWIGER A, STECKLEYS, TIMMONS S en CHENG C. Membrane changes in human platelets induced by lipopolysaccharide endotoxin. *Br J Haematol* 1977; 35 : 285-299.
- HEIMBURGER SL, McDOUGALS, WILMORE DW en PRUITT BA. Correction of hepatocellular dysfunction during endotoxemia. *J Surg Res* 1978; 24 : 442-448.
- HENDERSON JM, STEIN S, CHAWLA RK en RUDMAN D. The protein content of ascitic fluid. *Gastroenterology* 1979; 77 : A16.
- HERRING WB, HERION JC, WALKER RI en PALMER JG. Distribution and clearance of circulating endotoxin. *J Clin Invest* 1963; 42 : 79-87.
- HES VAN ZWEDEN FS. In vitro pyrogeenbepaling met de Limulus test. *Mededelingen van de Nederlandse Vereniging van Ziekenhuisapothekers* 1975; 32 : 186-195.
- HINSHAW LB. Concise review: the role of glucose in endotoxin shock. *Circ Shock* 1976; 3 : 1-10.
- HIRS CHW. Glycopeptides. *Methods Enzymol* 1967; 11 : 411-413.
- HOLLANDER VP en HARDING WC. A sensitive spectrophotometric method for measurement of plasma endotoxin. *Biochem Med* 1976; 15 : 28-33.

- HORISAWA M, GOLDSTEIN G, WAXMAN A en REYNOLDS T. The abnormal hepatic scan of chronic liver disease: its relationship to hepatic hemodynamics and colloid extraction. *Gastroenterology* 1976; 71 : 210-213.
- HUET P-M, CHARTRAND R en MARLEAU D. Extrahepatic uptake of ^{99m}Tc -phytate: its mechanism and significance in chronic liver disease. *Gastroenterology* 1980; 78 : 76-80.
- HUMPHREY CD, CONDON CW, CANTEY JR en PITTMAN FE. Partial purification of a toxin found in hamsters with antibiotic-associated colitis. Reversible binding of the toxin by cholestyramine. *Gastroenterology* 1979; 76 : 468-476.
- IEMHOFF WGJ, VAN DEN BERG JWO, DE PIJPER AM en HÜLSMANN WC. Metabolic aspects of isolated cells from rat small intestinal epithelium. *Biochem Biophys Acta* 1970; 215 : 229-241.
- JACOB AI, GOLDBERG PK, BLOOM N, DEGENSHEIN GA en KOZINN PJ. Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* 1977; 72 : 1268-1270.
- JORGENSEN JH, CARVAJAL HF, CHIPPS BE en SMITH RF. Rapid detection of Gram-negative bacteriuria by use of the Limulus endotoxin assay. *Appl Microbiol* 1973; 26 : 38-42.
- JORGENSEN JH en LEE JC. Rapid diagnosis of Gram-negative bacterial meningitis by the Limulus endotoxin assay. *J Clin Microbiol* 1978; 7 : 12-17.
- JORGENSEN JH en SMITH RF. Preparation, sensitivity, and specificity of Limulus lysate for endotoxin assay. *Appl Microbiol* 1973; 26 : 43-48.
- JORGENSEN JH en SMITH RF. Measurement of bound and free endotoxin by the Limulus assay. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974; 146 : 1024-1031.
- KABIR S, ROSENSTREICH DL en MERGENHAGEN SE. Bacterial endotoxins and cell membranes. In: Jeljaszewicz J en Wadström T, eds. *Bacterial toxins and cell membranes*. London: Academic Press, 1978 : 59-87.
- KAMPSCHMIDT RF en SCHULTZ GA. Hypoferremia in rats following injection of bacterial endotoxin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961; 106 : 870-871.
- KAMPSCHMIDT RF en UPCHURCH HF. Effects of bacteria endotoxin on plasma iron. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 110 : 191-193.
- KARANICOLAS S, OREOPOULOS DG, IZATT SH, SHIMIZU A, MANNING RF, SEPP H, DENEGER GA en DARBY T. Epidemic of aseptic peritonitis caused by endotoxin during chronic peritoneal dialysis. *N Engl J Med* 1977; 296 : 1336-1337.
- KATER L, JÖBSIS AC, BAART DE LA FAILLE-KUIJPER EH, VOGTEN AJM en GRIJM R. Alcoholic hepatic disease. Specificity of IgA deposits in liver. *Am J Clin Pathol* 1979; 71 : 51-57.
- KEARNEY JF en LAWTON AR. B Lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes. *J Immunol* 1975; 115 : 671-676.
- KEENE WR, SILBERMAN HR, LANDY M en STRELECKY KA. Observations on the pyrogenic response and its application to the bioassay of endotoxin. *J Clin Invest* 1961; 40 : 295-301.
- KERAAN M, MEYERS OL, ENGELBRECHT GHC, HICKMAN R, SAUNDERS SJ en TERBLANCHE J. Increased serum immunoglobulin levels following portocaval shunt in the normal rat. *Gut* 1974; 15 : 468-472.

- KEW MC, BRUNT PW, VARMA RR, HOURIGAN KJ, WILLIAMS HS en SHERLOCK S. Renal and intrarenal blood-flow in cirrhosis of the liver. *Lancet* 1971; 2 : 504-510.
- KIMURA H. Measurement of endotoxin. I. Fundamental studies on radioimmunoassay of endotoxin. *Acta Med Okayama* 1976; 30 : 245-255.
- KITANI K en TAPLIN GV. Catabolic pathway differences between ^{131}I - and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled albumin colloids and microaggregates. *J Nucl Med* 1972; 13 : 313-317.
- KLOCKARS M en ROBERTS P. Stimulation of phagocytosis by human lysozyme. *Acta Haematol* 1976; 55 : 289-295.
- KLUFT C. Blood fibrinolysis. Proactivators and activators in human plasma. Leiden: proefschrift, 1978.
- KOKOSHIS PL en DI LUZIO NR. Serum lysozyme: an index of macrophage function. *J Reticuloendothel Soc* 1979; 25 : 85-99.
- KOSTER F, LEVIN J, WALKER L, TUNG KSK, GILMAN RH, RAHAMAN MM, MAJID MA, ISLAM S en WILLIAMS RC. Hemolytic-uremic syndrome after shigellosis. Relation to endotoxemia and circulating immune complexes. *N Engl J Med* 1978; 298 : 927-933.
- KREEFTENBERG JG, LOGGEN HG, VAN RAMSHORST JD en BEUVERY EC. Limulus amebocyte lysate test micromethod and application in the control of sera and vaccines. *Develop Biol Standard* 1977; 34 : 15-20.
- LEIBOWITZ AI, VLADUTIU AO en NOLAN JP. Detection of a specific marker endotoxin in the blood of rats by a solid phase radioimmunoassay. *Gastroenterology* 1975; 69 : 1346.
- LEIBOWITZ AI, VLADUTIU AO en NOLAN JP. Immunoradiometric assay of endotoxin in serum. *Clin Chem* 1979; 25 : 68-70.
- LEIVE L en MORRISON DC. Isolation of lipopolysaccharides from bacteria. *Methods Enzymol* 1972; 28B : 254-262.
- LEVEEN HH, CHRISTOUDIAS G, IP M, LUFT R, FALK G en GROSBERG S. Peritoneo-venous shunting for ascites. *Ann Surg* 1974; 80 : 580-591.
- LEVIN J en BANG FB. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1964a; 115 : 265-274.
- LEVIN J en BANG FB. A description of cellular coagulation in the Limulus. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1964b; 115 : 337-345.
- LEVIN J en BANG FB. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh* 1968; 19 : 186-197.
- LEVIN J, POORE TE, YOUNG NS, MARGOLIS S, ZAUBER NP, TOWNES AS en BELL WR. Gram-negative sepsis: detection of endotoxemia with the Limulus test. With studies of associated changes in blood coagulation, serum lipids, and complement. *Ann Intern Med* 1972; 76 : 1-7.
- LEVIN J, POORE TE, ZAUBER NP en OSER RS. Detection of endotoxin in the blood of patients with sepsis due to Gram-negative bacteria. *N Engl J Med* 1970a; 283 : 1313-1316.
- LEVIN J, TOMASULO PA en OSER RS. Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor. *J Lab Clin Med* 1970b; 75 : 903-911.
- LEVINSKY NG. The renal kallikrein-kinin system. *Circ Res* 1979; 44 : 441-451.

- LEVY VG, OPOLON P, PAULEAU N en CAROLI J. Treatment of ascites by reinfusion of concentrated peritoneal fluid-review of 318 procedures in 210 patients. *Postgrad Med J* 1975; 51 : 564-566.
- LIEHR H en GRÜN M. Clinical aspects of Kupffer cell failure in liver diseases. In: Wisse E en Knook DL eds. *Kupffer cells and other liver sinusoidal cells*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1977 : 427-436.
- LIEHR H en GRÜN M. Endotoxinämie und Enzephalopathie - ein pathogenetischer Zusammenhang. In: Wervalka F en Dragosics B eds. *Aminosäuren, Ammoniak und hepatische Enzephalopathie*. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag, 1978 : 22-30.
- LIEHR H en GRÜN M. Endotoxins in liver disease. In: Popper H en Schaffner F eds. *Progress in liver diseases*, vol VI. New York: Grune and Stratton, 1979: 313-326.
- LIEHR H, GRÜN M, BRUNSWIG D en SAUTTER T. Endotoxaemia in liver cirrhosis: treatment with polymyxin B. *Lancet* 1975a; 1 : 810-811.
- LIEHR H, GRÜN M, BRUNSWIG D en SAUTTER T. Endotoxinämie bei Leberzirrhose. *Z Gastroenterol* 1976; 14 : 14-23.
- LIEHR H, GRÜN M, THIEL H, BRUNSWIG D en RASENACK U. Endotoxin-induced liver necrosis and intravascular coagulation in rats enhanced by portocaval collateral circulation. *Gut* 1975b; 16 : 429-436.
- LIU YK. Phagocytic capacity of reticuloendothelial system in alcoholics. *J Reticuloendothel Soc* 1979; 25 : 605-613.
- LOEGERING DJ, KAPLAN JE en SABA TM. Correlation of plasma lysosomal enzyme levels with hepatic reticuloendothelial function after trauma. *Proc Soc Exp Biol Med* 1976; 152 : 42-46.
- LOEGERING DJ en SABA TM. Hepatic Kupffer cell dysfunction during hemorrhagic shock. *Circ Shock* 1976; 3 : 107-113.
- LÖFSTRÖM B en SCHILDT B. Reticuloendothelial function under general anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1974; 18 : 34-40.
- LOPES J en INNIS WE. Electron microscopy of effect of polymyxin on *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Bacteriol* 1969; 100 : 1128-1130.
- LOURIA DB. Susceptibility to infection during experimental alcohol intoxication. *Trans Assoc Am Physicians* 1963; 76 : 102-112.
- MacPHERSON BR en PFEIFFER CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion* 1978; 17 : 135-150.
- MARTINEZ-G LA, QUINTILIANI R en TILTON RC. Clinical experience on the detection of endotoxemia with the Limulus test. *J Infect Dis* 1973; 127 : 102-105.
- MARTINI GA, PHEAR EA, RUEBNER B en SHERLOCK S. The bacterial content of the small intestine in normal and cirrhotic subjects: relation to methionine toxicity. *Clin Sci* 1957; 16 : 35-51.
- MASSARRAT Sch en MASSARRAT Sa. Transient liver deterioration induced by general anaesthesia. *Acta Hepatogastroenterol* 1979; 26 : 106-111.
- MATSESHE JW, BEART RW, BARTHOLOMEW LG en BALDUS WP. Fatal disseminated intravascular coagulation after peritoneovenous shunt for intractable ascites. *May Clin Proc* 1978; 53 : 526-528.

- McAULEY RJ, ICE RD en CURTIS EG. The Limulus test for in vitro pyrogen detection. *Am J Hosp Pharm* 1974; 31 : 688-691.
- McGILL MW, PORTER PJ en KASS EH. The use of a bioassay for endotoxin in clinical infections. *J Infect Dis* 1970; 121 : 103-112.
- McGIVNEY A en BRADLEY SG. Effects of bacterial endotoxin on lysosomal and mitochondrial enzyme activities of established cell cultures. *J Reticuloendothel Soc* 1979; 26 : 307-316.
- MEIER HL, PIERCE JV, COLMAN RW en KAPLAN AP. Activation and function of human Hageman factor. The role of high molecular weight kininogen and prekallikrein. *J Clin Invest* 1977; 60 : 18-31.
- MERGENHAGEN SE, SNYDERMAN R en PHILIPS JK. Activation of complement by endotoxin. *J Infect Dis* 1973; S128 : S86-S90.
- MERTZ W. Chromium and its relation to carbohydrate metabolism. In: Burch RE en Sullivan JF eds. *Medical Clinics of North America: Symposium on trace elements*. Philadelphia: Saunders, 1976; 60 : 739-744.
- MILLS DF. Pyrogen (Limulus amoebocyte lysate) for detection of endotoxins. Mallinckrodt, Inc. 1978; 1-32.
- MIRD. Dose estimate report no. 3. Summary of current radiation dose estimates to humans with various liver conditions from ^{99m}Tc -sulfur colloid. *J Nucl Med* 1975; 16 : 108A-108B.
- MÖLLER G, SJÖBERG O en ANDERSSON J. Immunogenicity, tolerogenicity, and mitogenicity of lipopolysaccharides. *J Infect Dis* 1973; S128 : S52-S56.
- MORRISON DC en COCHRANE CG. Direct evidence for Hageman factor (factor XII) activation by bacterial lipopolysaccharides (endotoxins). *J Exp Med* 1974; 140 : 797-811.
- MORRISON DC en JACOBS DM. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry* 1976; 13 : 813-818.
- MORRISON DC en KLINE LF. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J Immunol* 1977; 118 : 362-368.
- MORRISON DC en LEIVE L. Fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 0111 : B4 prepared by two extraction procedures. *J Biol Chem* 1975; 250 : 2911-2919.
- MUNDSCHEK H, HROMEC A en FISCHER J. Phagocytic activity of the liver as a measure of hepatic circulation - a comparative study using ^{198}Au and ^{99m}Tc -sulfur colloid. *J Nucl Med* 1971; 12 : 711-718.
- MUNFORD RS. Endotoxin(s) and the liver. *Gastroenterology* 1978; 75 : 532-535.
- MURATA H, KOBAYASHI M, LIO M, YAMADA H, CHIBA K, MATSUI K en KAWAGUCHI S. Sensitivity of the Limulus test and inhibitory factors in the radiopharmaceuticals. *J Nucl Med* 1976; 17 : 1088-1092.
- NACHUM R, LIPSEY A en SIEGEL SE. Rapid detection of gram-negative bacterial meningitis by the Limulus lysate test. *N Engl J Med* 1973; 289 : 931-934.
- NANDAN R, NAKASHIMA CY en BROWN DR. Detection of endotoxins in human blood and plasma. An improved in-vitro pyrogen test. *Clin Chem* 1977; 23 : 2080-2084.
- NEDERLANDSE FARMACOPÉE, achtste uitgave, deel I. 's-Gravenhage: Staatsuitgeverij, 1978 : 158-160.

- NETER E, WESTPHAL O, LÜDERITZ O, GORZYNSKI EA en EICHENBERGER E. Studies on enterobacterial lipopolysaccharides. Effects of heat and chemicals on erythrocyte-modifying, antigenic, toxic and pyrogenic properties. *J Immunol* 1956; 76 : 377-385.
- NICHOLAS GC, MELA LM en MILLER LD. Early alterations in mitochondrial membrane transport during endotoxemia. *J Surg Res* 1974; 16 : 375-383.
- NOLAN JP. The role of endotoxin in liver injury. *Gastroenterology* 1975; 69 : 1346-1356.
- NOLAN JP. The contribution of gut-derived endotoxins to liver injury. *Yale J Biol Med* 1979; 52 : 127-133.
- NOLAN JP en ALI MV. Effect of cholestyramine on endotoxin toxicity and absorption. *Am J Dig Dis* 1972; 17 : 161-166.
- NOLAN JP, HARE DK, McDEVITT JJ en ALI MV. In vitro studies of intestinal endotoxin absorption. I. Kinetics of absorption in the isolated everted gut sac. *Gastroenterology* 1977; 72 : 434-439.
- NOLAN JP en LEIBOWITZ AI. Endotoxin and the liver. III. Modification of acute carbon tetrachloride injury by polymyxin B- an antiendotoxin. *Gastroenterology* 1978; 75 : 445-449.
- NOLAN JP, McDEVITT JJ en GOLDMANN GS. Endotoxin binding by charged and uncharged resins. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975; 149 : 766-770.
- VAN NOORDWIJK J en DE JONG Y. Comparison of the Limulus test for endotoxin with the rabbit test for pyrogens of the European Pharmacopoeia. *J Biol Stand* 1976; 4 : 131-139.
- NOWOTNY A. Molecular aspects of endotoxic reactions. *Bacteriol Rev* 1969; 33 : 72-98.
- OLLODART RM, HAWTHORNE I en ATTAR S. Studies in experimental endotoxemia in man. *Am J Surg* 1967; 113 : 599-607.
- ORLOFF MJ, PESKIN GW en ELLIS HL. A bacteriologic study of human portal blood. Implications regarding hepatic ischemia in man. *Ann Surg* 1958; 148 : 738-746.
- ORREGO H, BLENDIS LM, BLAKE JE, KAPUR BM en ISRAEL Y. Reliability of assessment of alcohol intake based on personal interviews in a liver clinic. *Lancet* 1979; 2 : 1354-1356.
- PALMER JD en RIFKIND D. Neutralization of the hemodynamic effects of endotoxin by polymyxin B. *Surg Gynecol Obstet* 1974; 138 : 755-759.
- PAPPER S. Renal failure in cirrhosis (the hepatorenal syndrome). In: Epstein M ed. *The kidney in liver disease*. New York: Elsevier, 1978 : 91-112.
- PENNINGTON JE. Lipopolysaccharide pseudomonas vaccine: efficacy against pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1979; 140 : 73-80.
- PIERONI RE, BRODERICK EJ, BUNDEALLY A en LEVINE L. A simple method for the quantitation of submicrogram amounts of bacterial endotoxin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970; 133 : 790-794.
- POLLER L. Coagulation abnormalities in liver disease. In: Poller L ed. *Recent advances in blood coagulation* (number 2). Edinburgh: Churchill Livingstone, 1977: 267-292.
- POPPER H. Summary. In: Wisse E en Knook DL eds. *Kupffer cells and other liver sinusoidal cells*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1977 : 509-514.

- PRASAD AS. Chromium. In: Trace elements and iron in human metabolism. Chichester: John Wiley and Sons, 1978 : 3-15.
- PROTELL RL, SOLOWAY RD, MARTIN WJ, SCHOENFIELD LJ en SUMMERSKILL WHJ. Anti-salmonella agglutinins in chronic active liver disease. *Lancet* 1971; 2 : 330-332.
- PRUZANSKI W en WILSON DR. Renal handling of endogenous lysozyme in man. *J Lab Clin Med* 1977; 90 : 61-67.
- PRYTZ H, BJÖRNEBOE M, CHRISTOFFERSEN P, POULSEN H en ÖRSKOV F. Correlation between hepatic morphology and immunoglobulins and antibodies to *Escherichia coli* in cirrhosis. *Gut* 1977; 18 : 28-32.
- PRYTZ H, BJÖRNEBOE M, ÖRSKOV F en HILDEN M. Antibodies to *Escherichia coli* in alcoholic and non-alcoholic patients with cirrhosis of the liver or fatty liver. *Scand J Gastroenterol* 1973; 8 : 433-438.
- PRYTZ H, BJÖRNEBOE M, STAEHR JOHANSEN T en ÖRSKOV F. The influence of portosystemic shunt operation on immunoglobulins and *Escherichia coli* antibodies in patients with cirrhosis of the liver. *Acta Med Scand* 1974; 196 : 109-112.
- PRYTZ H, HOLST-CHRISTENSEN J, KORNER B en LIEHR H. Portal venous and systemic endotoxaemia in patients without liver disease and systemic endotoxaemia in patients with cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 1976; 11 : 857-863.
- RAMADORI G, HOPF U en MEYER ZUM BUSCHENFELDE KH. Binding sites for endotoxic lipopolysaccharide on the plasma membrane of isolated rabbit hepatocytes. *Acta Hepatogastroenterol* 1979; 26 : 368-374.
- RANDOLPH WF. Licensing of *Limulus* amoebocyte lysate. Use as an alternative for rabbit pyrogen test. *Federal Register* 1977; 42 : 57749-57750.
- RASENACK U, GRÜN M en LIEHR H. Galactosamine-"hepatitis" in rats with different phagocytic activity of liver RES. *Acta Hepatogastroenterol* 1974; 22 : 29-35.
- RAVIN HA, ROWLEY D, JENKINS C en FINE J. On the absorption of bacterial endotoxin from the gastro-intestinal tract of the normal and shocked animal. *J Exp Med* 1960; 112 : 783-792.
- REINHOLD RB, CARIDIS DT en FINE J. Diagnosis of clinical endotoxemia. *J Reprod Med* 1972; 8 : 335-339.
- REINHOLD RB en FINE J. A technique for quantitative measurement of endotoxin in human plasma. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 137 : 334-340.
- RIETSCHEL ET. Chemical structure and biological activity of endotoxins (lipopolysaccharides) and lipid A. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1975; 287 : 73-84.
- RIETSCHEL ET en LÜDERITZ O. Chemical structure of lipopolysaccharides and endotoxin immunity. *Z Immunitätsforsch Immunobiol* 1975; 149 : 201-213.
- ROBINSON JA, KLODNYCKY ML, LOEB HS, RACIC MR en GUNNAR RM. Endotoxin, prekallikrein, complement and systemic vascular resistance. Sequential measurements in man. *Am J Med* 1975; 59 : 61-67.
- ROJAS-CORONA RR, SKARNES R, TAMAKUMA S en FINE J. The *Limulus* coagulation test for endotoxin. A comparison with other assay methods. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969; 132 : 599-601.

- ROSE WC, BRADLEY SG en LEE IP. Potentiation of the toxicity of several antitumor agents by *Salmonella typhosa* endotoxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; 23 : 102-111.
- ROSS S, RODRIGUEZ W, CONTRONI G, KORENGOLD G, WATSON S en KHAN W. Limulus lysate test for Gram-negative bacterial meningitis. Bedside application. *JAMA* 1975; 233 : 1366-1369.
- ROSSEN RD, WOLFF SM en BUTLER WT. The antibody response in nasal washings and serum to *S. typhosa* endotoxin administered intravenously. *J Immunol* 1967; 99 : 246-254.
- RUDBACH JA, AKIYA FJ, ELIN RJ, HOCHSTEIN HD, LUOMA MK, MILNER ECB, MILNER KC en THOMAS KR. Preparation and properties of a national reference endotoxin. *J Clin Microbiol* 1976; 3 : 21-25.
- RUITER DJ, VAN DER MEULEN J en WISSE E. Some cell biological and pathological aspects of the endotoxin uptake by the liver. In: Liehr H en Grün M eds. *The reticuloendothelial system and the pathogenesis of liver disease*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980 : 267-277.
- SABA TM. Physiology and physiopathology of the reticuloendothelial system. *Arch Intern Med* 1970; 126 : 1031-1052.
- SABA TM en JAFFE E. Plasma fibronectin (opsonic glycoprotein): Its synthesis by vascular endothelial cells and role in cardiopulmonary integrity after trauma as related to reticuloendothelial function. *Am J Med* 1980; 68 : 577-594.
- SAITO H. Determination of Hageman factor (HG, factor XII) and plasma prekallikrein (Fletcher factor) by radioimmunoassays. *Adv Exp Med Biol* 1979; 120 A : 165-172.
- SAITO H, POON M-C, VICIC W, GOLDSMITH GH en MENITOVE JE. Human plasma prekallikrein (Fletcher factor) clotting activity and antigen in health and disease. *J Lab Clin Med* 1978; 92 : 84-95.
- SCHAFFNER F en POPPER H. Capillarization of hepatic sinusoids in man. *Gastroenterology* 1963; 44 : 239-242.
- SCHATTEN WE, DESPREZ JD en HOLDEN WD. A bacteriologic study of portal-vein blood in man. *Arch Surg* 1955; 71 : 404-409.
- SCHUMER W, DAS GUPTA TK, MOSS GS en NIJHUS LM. Effect of endotoxemia on liver cell mitochondria in man. *Ann Surg* 1970; 171 : 875-882.
- SCHWARTZ ML, SWAIM WR en VOGEL SB. Coagulopathy following peritoneovenous shunting. *Surgery* 1979; 85 : 671-676.
- SELYE H, TUCHWEBER B en BERTÖK L. Effect of lead acetate on the susceptibility of rats to bacterial endotoxins. *J Bacteriol* 1966; 91 : 884-890.
- SHANDS JW. Affinity of endotoxin for membranes. *J Infect Dis* 1973; S128 : S197-S201.
- SHANDS JW, GRAHAM JA en NATH K. The morphological structure of isolated bacterial lipopolysaccharide. *J Mol Biol* 1967; 25 : 15-21.
- SHEAGREN JN, WOLFF SM en SHULMAN NR. Febrile and hematological responses of rhesus monkeys to bacterial endotoxin. *Am J Physiol* 1967; 212 : 884-890.
- SHERLOCK S. Acute (fulminant) hepatic failure. In: *Diseases of the liver and biliary system*, 5e editie. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975a: 107-121.

- SHERLOCK S. Ascites. In: Diseases of the liver and biliary system, 5e editie. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975b: 122-149.
- SHUTE K. Effect of intraluminal oxygen on endotoxin absorption in experimental occlusion of the superior mesenteric artery. Gut 1977; 18 : 567-570.
- SIMJEE AE, HAMILTON-MILLER JMT, THOMAS HC, BRUMFITT W en SHERLOCK S. Antibodies to *Escherichia coli* in chronic liver diseases. Gut 1975; 16 : 871-875.
- SLEISENGER MH en KIM YS. Protein digestion and absorption. N Engl J Med 1979; 300 : 659-663.
- SMITH RT en THOMAS L. The lethal effect of endotoxins on the chick embryo. J Exp Med 1956; 104 : 217-231.
- SPIRER Z, ZAKUTH V, DIAMANT S, MONDORF W, STEFANESCU T, STABINSKY Y en FRIDKIN M. Decreased tuftsin concentrations in patients who have undergone splenectomy. Br Med J 1977; 2 : 1574-1576.
- STARZECKI B, REDDIN JL, GRAN A en SPINK WW. Distribution of endotoxin-⁵¹Cr in normal and endotoxin-resistant dogs. Am J Physiol 1967; 213 : 1065-1071.
- STIFFEL C, MOUTON D en BIOZZI G. Kinetics of the phagocytic function of reticulo-endothelial macrophages in vivo. In: Van Furth R ed. Mononuclear phagocytes. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970: 335-381.
- STOBO J. Cirrhosis and hypergammaglobulinemia. Dig Dis Sci 1979; 24 : 737-740.
- STORMORKEN H, BAKLUND A, GALLIMORE M en RITLAND S. Chromogenic substrate assay of plasma prekallikrein. With a note on its site of biosynthesis. Haemostasis 1978; 7 : 69-75.
- STUMACHER RJ, KOVNAT MJ en McCABE WR. Limitations of the usefulness of the Limulus assay for endotoxin. N Engl J Med 1973; 288: 1261-1264.
- SULLIVAN JD en WATSON SW. Factors affecting the sensitivity of Limulus lysate. Appl Microbiol 1974; 28 : 1023-1026.
- TAI JY, SEID RC, HUHN RD en LIU T-Y. Studies on Limulus amoebocyte lysate. II. Purification of the coagulogen and the mechanism of clotting. J Biol Chem 1977; 252 : 4773-4776.
- TAMAKUMA S, ROJAS-CORONA R, CUEVAS P en FINE J. Demonstration of a lethal endotoxemia of intestinal origin in refractory non-septic shock. Ann Surg 1971; 173 : 219-224.
- TARAO K, SO K, MOROI T, IKEUCHI T, SUYAMA T, ENDO O en FUKUSHIMA K. Detection of endotoxin in plasma and ascitic fluid of patients with cirrhosis: its clinical significance. Gastroenterology 1977; 73 : 539-542.
- TAYLOR FW. Blood-culture studies of the portal vein. Arch Surg 1956; 72 : 889-892.
- TERPSTRA OT. Portale hypertensie. Een experimenteel model met dimethylnitrosamine. Rotterdam: proefschrift, 1979.
- TERPSTRA OT, VAN VLIET ACM, VAN URK H, BRUINING HA, WILSON JHP en VAN VROONHOVEN TJMV. De mesocavale interpositieshunt bij de behandeling van bloedingen uit slokdarmvarices. Ned Tijdschr Geneesk 1980, ter perse.

- VAN THIEL DH, GAVALER JS, SLONE FI, COBB CF, SMITH WI, BRON KM en LESTER R. Is feminization in alcoholic men due in part to portal hypertension: a rat model. *Gastroenterology* 1980; 78 : 81-91.
- THOMAS HC en JEWELL DP. Influence of the liver on the immune response. In: *Clinical gastrointestinal immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1979a: 38-52.
- THOMAS HC en JEWELL DP. Alcoholic and drug-induced liver disease. In: *Clinical gastrointestinal immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1979b: 241-255.
- THOMAS HC, McSWEEN RNM en WHITE RG. Role of the liver in controlling the immunogenicity of commensal bacteria in the gut. *Lancet* 1973; 1 : 1288-1291.
- TOMASULO PA, MARCH SC en LEVIN J. Tritiation of endotoxin. *Biochim Biophys Acta* 1975; 400 : 399-406.
- TREWBY PN en WILLIAMS R. Pathophysiology of hypotension in patients with fulminant hepatic failure. *Gut* 1977; 18 : 1021-1026.
- TRIGER DR, ALP MH en WRIGHT R. Bacterial and dietary antibodies in liver disease. *Lancet* 1972; 1 : 60-63.
- TRIGER DR, BOYER TD en LEVIN J. Portal and systemic bacteraemia and endotoxaemia in liver disease. *Gut* 1978; 19 : 935-939.
- TRIGER DR en WRIGHT R. Hyperglobulinaemia in liver disease. *Lancet* 1973; 1 : 1494-1496.
- USP XIX. United States Pharmacopeia XIX, USP convention. Easton: Mack Publishing Company, 1975 : 613.
- UTILI R, ABARNATHY CO en ZIMMERMAN HJ. Cholestatic effects of *Escherichia coli* endotoxin on the isolated perfused rat liver. *Gastroenterology* 1976; 70 : 248-253.
- UTILI R, ABARNATHY CO en ZIMMERMAN HJ. Endotoxin effects on the liver. *Life Sci* 1977a; 20 : 553-568.
- UTILI R, ABARNATHY CO en ZIMMERMAN HJ. Inhibition of Na⁺, K⁺-adenosine-triphosphatase by endotoxin: a possible mechanism for endotoxin-induced cholestasis. *J Infect Dis* 1977b; 136 : 583-587.
- VAN VLIET ACM. Endotoxinen en de lever. In: Gips CH en Wilson JHP eds. *Lever en galwegen-diagnostiek en therapie*. Utrecht: Bohn, Scheltema en Holkema, 1979 : 164-166.
- VAN VLIET ACM, FRENKEL M en WILSON JHP. Acute leverinsufficiëntie na opipramolgebruik. *Ned Tijdschr Geneeskd* 1977; 121 : 1325-1327.
- VAN VLIET ACM, VAN VLIET HHDM, DZOLJIC-DANILOVIC G en WILSON JHP. Plasma prekallikrein and endotoxemia in liver cirrhosis. *Thromb Haemost* 1980a; ter perse.
- VAN VLIET ACM, MAAS HCM en WILSON JHP. The effect of portasystemic shunting and RES function on endotoxemia in human liver disease. In: Liehr H en Grün M eds. *The reticuloendothelial system and the pathogenesis of liver disease*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980 : 159-164.
- WACHTEL RE en TSUJI K. Comparison of *Limulus* amoebocyte lysates and correlation with the United States Pharmacopeial pyrogen test. *Appl Environ Microbiol* 1977; 33 : 1265-1269.

- WARDLE EN. Endotoxaemia in liver disease. *Lancet* 1974; 1 : 930-931.
- WARDLE EN. Endotoxin and acute renal failure. *Nephron* 1975; 14 : 321-332.
- WARSCHAW AL, WALKER WA en ISSELBACHER KJ. Protein uptake by the intestine: evidence for absorption of intact macromolecules. *Gastroenterology* 1974; 66 : 987-992.
- WESTPHAL O. Bacterial endotoxins. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1975; 49 : 1-43.
- WESTPHAL O, LÜDERITZ O en BISTER F. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Naturforsch* 1952; 7b : 148-155.
- WILDFEUER A, HEYMER B, SCHLEIFER KH en HAFERKAMP O. Investigations on the specificity of the Limulus test for the detection of endotoxin. *Appl Microbiol* 1974; 28 : 867-871.
- WILKINSON SP. Endotoxins and liver disease. *Scand J Gastroenterol* 1977; 12 : 385-386.
- WILKINSON SP, ARROYO V, GAZZARD BG, MOODIE H en WILLIAMS R. Relation of renal impairment and haemorrhagic diathesis to endotoxaemia in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1974; 1 : 521-524.
- WILKINSON SP, DAVIES MH, PORTMANN B en WILLIAMS R. Renal failure in otherwise uncomplicated acute viral hepatitis. *Br Med J* 1978a; 2 : 338-341.
- WILKINSON SP, MOODIE H, STAMATAKIS JD, KAKKAR VV en WILLIAMS R. Endotoxaemia and renal failure in cirrhosis and obstructive jaundice. *Br Med J* 1976; 2 : 1415-1418.
- WILKINSON SP, PORTMANN B, HURST D en WILLIAMS R. Pathogenesis of renal failure in cirrhosis and fulminant hepatic failure. *Postgrad Med J* 1975; 51 : 503-505.
- WILKINSON SP, SMITH JK en WILLIAMS R. Renal failure in liver disease: role of endotoxins and renin-angiotensin system. In: Epstein M ed. *The kidney in liver disease*. New York: Elsevier, 1978b: 113-120.
- WINKLER K, BASS L, KEIDING S en TYGSTRUP N. The physiologic basis for clearance measurements in hepatology. *Scand J Gastroenterol* 1979; 14 : 439-448.
- WISSE E. Ultrastructure and function of Kupffer cells and other sinusoidal cells in the liver. In: Wisse E en Knook DL eds. *Kupffer cells and other liver sinusoidal cells*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland, 1977: 33-60.
- WISSE E en KNOOK DL eds. *Kupffer cells and other liver sinusoidal cells*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland, Biomedical Press, 1977.
- WITT I. Neue Methoden der Gerinnungsanalyse mit chromogenen Substraten. *J Clin Chem Clin Biochem* 1977; 15 : 239-244.
- WIZNITZER T, SCHWEINBURG FB, ATKINS N en FINE J. On the relation of the size of the intraintestinal pool of endotoxin to the development of irreversibility in hemorrhagic shock. *J Exp Med* 1960; 112 : 1167-1171.
- WOLFF SM. Biological effects of bacterial endotoxins in man. *J Infect Dis* 1973; S128 : S259-S264.
- WOLFF SM, MULHOLLAND JH en WARD SB. Quantitative aspects of the pyrogenic response of rabbits to endotoxin. *J Lab Clin Med* 1965; 65 : 268-276.
- WOLTER J, LIEHR H en GRÜN M. Hepatic clearance of endotoxins: differences in arterial and portal venous infusion. *J Reticuloendothel Soc* 1978; 23 : 145-152.

- WONG PY. The kallikrein-kinin and related vasoactive systems in cirrhosis of the liver. In: Epstein M ed. The kidney in liver disease. New York: Elsevier, 1978 : 299-310.
- WONG PY, McCOY GC, SPIELBERG A, MILORA RV en BALINT JA. The hepatorenal syndrome. Gastroenterology 1979; 77 : 1326-1334.
- WONG PY, TALAMO RC en WILLIAMS GH. Kallikrein-kinin and renin-angiotensin systems in functional renal failure of cirrhosis of the liver. Gastroenterology 1977; 73 : 1114-1118.
- WOODRUFF PWH, O'CARROLL DI, KOIZUMI S en FINE J. Role of the intestinal flora in major trauma. J Infect Dis 1973; S128 : S290-S294.
- WORTHINGTON BS, MESEROLE L en SYROTUCK JA. Effect of daily ethanol ingestion on intestinal permeability to macromolecules. Am J Dig Dis 1978; 23 : 23-32.
- YAMADA KM en OLDEN K. Fibronectins - adhesive glycoproteins of cell surface and blood. Nature 1978; 275 : 179-184.
- YIN ET. Endotoxin, thrombin, and the Limulus amoebocyte lysate test. J Lab Clin Med 1975; 86 : 430-434.
- YIN ET, GALANOS C, KINSKY S, BRADSHAW RA, WESSLER S, LÜDERITZ O en SARMIENTO ME. Picogram-sensitive assay for endotoxin: gelation of *Limulus polyphemus* blood cell lysate induced by purified lipopolysaccharides and lipid A from Gram-negative bacteria. Biochim Biophys Acta 1972; 261 : 284-289.
- YOUNG LS, MARTIN WJ, MEYER RD, WEINSTEIN RJ en ANDERSON ET. Gram-negative rod bacteremia: microbiologic, immunologic, and therapeutic considerations. Ann Intern Med 1977; 86 : 456-471.
- ZIMMERMAN DH en KERN M. A simple procedure for labeling the lipid A moiety of lipopolysaccharide with ¹²⁵J. Anal Biochem 1977; 77 : 340-345.
- ZIMMERMAN HJ, FANG M, UTILI R, SEEFF LB en HOOFNAGLE J. Jaundice due to bacterial infection. Gastroenterology 1979; 77 : 362-374.

VERANTWOORDING

Dit proefschrift werd bewerkt op de afdeling Inwendige Geneeskunde II in samenwerking met andere afdelingen, vooral de afdeling Klinische Microbiologie en Antimicrobiële Therapie, van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam-Dijkzigt. Voor de uiteindelijke totstandkoming is dank verschuldigd aan vele mensen, die mij daarbij tot hulp en steun zijn geweest. Ik wil hen allen hartelijk bedanken en enkelen met name noemen.

Professor Wilson, beste Paul, reeds in het begin van mijn opleiding tot internist wist je mij te interesseren voor de functie van het reticulo-endotheliale systeem m.n. van de lever. Daarbij raakten we geboeid door de betekenis die de Kupffercellen hebben bij de verwijdering van endotoxinen uit het bloed. Hierdoor werd de basis gelegd voor zowel het innerlijk als het uiterlijk van dit proefschrift. Paul, de ongedwongen en plezierige wijze waarop ik de afgelopen jaren met je heb mogen samenwerken, de vrijheid die je me daarbij tevens gaf, evenals jouw optimisme, worden door mij zeer gewaardeerd.

Professor Dr. M.F. Michel wil ik bedanken voor de fijne samenwerking die ik met hem en zijn afdeling mocht hebben. Voorts ben ik hem veel dank verschuldigd voor het kritisch doorlezen van het manuscript. Bij de interpretatie van de verkregen gegevens heeft hij mij behoed voor niet geheel verantwoorde conclusies.

Professor Dr. D.L. Westbroek leverde als co-referent waardevolle opmerkingen. Dankbaar werd daarvan gebruik gemaakt.

H.C.M. Maas, beste Herma, jouw doorzettingsvermogen, vooral in de moeizame beginfase van de endotoxinenbepaling, zijn van grote betekenis geweest voor dit proefschrift. Het enthousiasme waarmee jij werkte, evenals de plezierige wijze waarop ik met je mocht samenwerken zullen mij heel lang bij blijven.

Drs. G. Džoljić-Danilović, beste Gordona, de vele gesprekken die ik in de loop der tijd met jou had, evenals jouw gastvrijheid, zijn voor mij van grote steun en waarde geweest.

Dr. J.W.O. van den Berg, beste Wim, jouw hulp bij het werken met radio-activiteit, en jouw lessen bij de bestudering van de absorptie van endotoxinen, zijn van onmisbare waarde geweest. Ook voor de adviezen, bij de uitwerking en beschrijving van de daarbij verkregen gegevens, mijn dank.

Dank ben ik ook verschuldigd voor de medewerking van de afdeling Hematologie (Dr. J. Lindemans, Dr. H.H.D.M. van Vliet), de afdeling Nucleaire Geneeskunde (Drs. W.H. Bakker) en het Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium (Dr. B.G. Blijenberg).

Van de statistische adviezen van Ir. P.I.M. Schmitz van de afdeling Biostatistica werd dankbaar gebruik gemaakt.

De vele bezoeken aan het Statusarchief waren nooit tevergeefs. Steeds weer gelukte het me aldaar de benodigde patiëntengegevens op te sporen dan wel op het spoor te komen.

René van Zanten verleende mij, deels in het kader van zijn keuzep practicum, assistentie bij de praktische uitvoering van diverse gedeelten van het onderzoek.

Annemarie Geevers was me behulpzaam bij het in de loop der tijd verzamelen van de vele bloedmonsters.

De figuren in dit proefschrift werden vervaardigd door de medewerkers van de Grafische Studio van de Audiovisuele Dienst van de Erasmus Universiteit.

Het uiteindelijke typewerk werd spontaan en op hoge snelheid verricht door Marieke Horsch-Blekkingh, en later door Diny van Emmerik-Schipper.

De uiteindelijke vormgeving van dit proefschrift kwam tot stand dankzij E.J.W. Davids.

Last but not least wil ik mijn ouders en Nanny bedanken. Mijn opleiding evenals dit proefschrift is ook jullie offer. Ik ben jullie daarvoor zeer dankbaar.

CURRICULUM VITAE

De schrijver van dit proefschrift werd geboren op 3 augustus 1950 te Vlaardingen. Na de MULO-B opleiding (St. Jozef MULO te Schiedam) werd in 1968 het HBS-B diploma behaald aan de Rijks HBS te Schiedam. In datzelfde jaar werd begonnen met de studie in de geneeskunde aan de Medische Faculteit te Rotterdam. Gedurende 1971 was hij werkzaam op de afdeling Fysiologie II (Prof. Dr. G.H. Zeilmaker) in en buiten het kader van een keuzepracticum waarbij de rijping van oöcyten bestudeerd werd. Het artsexamen werd afgelegd in de zomer van 1974.

Na een wisselassistentschap in het Nolet Ziekenhuis te Schiedam werd op 1 januari 1975 de opleiding tot internist begonnen aan de afdeling Inwendige Geneeskunde II (Hoofd: Prof. Dr. M. Frenkel) van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam-Dijkzigt. Op 1 januari 1980 werd hij ingeschreven in het specialistenregister. Tijdens en enige tijd na de opleiding tot internist werd het onderzoek naar endotoxinemie bij leverziekten verricht.

Vanaf juni 1980 is hij als internist verbonden aan het Refaja Ziekenhuis te Dordrecht.

Lettertype omslag: "University Roman"